



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MEDICO COM VISTA A ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DO MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

LEANDRO JORGE NUNES DE CARVALHO OLIVEIRA

**SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E NEUROPROTECÇÃO NO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

TRABALHO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE FARMACOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOBRE A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA TICE DOS REIS ANASTÁCIO DE MACEDO**

MARÇO, 2009

Nemo nascitur sapiens

Agradecimentos

Agradeço à Sr^a. Professora Doutora Tice Dos Reis Anastácio de Macedo, todo o tempo e dedicação dispensados.

Agradeço igualmente aos Prof. Javier Fernandez Ruiz, Prof. Lumir Hanus, Prof. Raphael Mechoulam, pelos artigos científicos que gentilmente me cederam.

Resumo

Introdução: Neuroprotecção é a estratégia terapêutica que tenta impedir ou atrasar a perda neuronal e, portanto, a evolução de uma doença. Em contraste com as terapêuticas sintomáticas, as estratégias neuroprotectoras actuam nos mecanismos patológicos subjacentes às manifestações clínicas da doença.

Os canabinóides têm emergido como moléculas promissoras em neuroprotecção, com potencial clínico, por serem capazes de reduzir a excitotoxicidade, o influxo de cálcio e as lesões oxidativas. São igualmente capazes de ajudar a promover a sobrevivência da tecido neuronal lesado, recuperar neurónios da hipoxia ou trauma e diminuir a inflamação ao actuarem em processos da glia que regulam a sobrevivência neuronal e restaurar o suprimento sanguíneo à área lesionada por reduzirem a vasoconstrição produzida por vários factores derivados do endotélio.

Objectivos: Demonstrar, à luz dos conhecimentos actuais, a neuroprotecção no sistema nervoso central induzida pela activação do sistema endocanabinóide. Serão sumariamente descritos os avanços mais recentes do conhecimento sobre mecanismos celulares e moleculares pelos quais os canabinóides podem impedir/atrasar a degeneração, a tumorigénese e proteger de insultos agudos, providenciando desta forma neuroprotecção no sistema nervoso central.

Desenvolvimento: Através de um ou mais destes processos, os canabinóides podem providenciar neuroprotecção em diferentes patologias do sistema nervoso central, quer agudas, como traumatismos craneanos ou acidentes vasculares, quer em doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e esclerose múltipla, entre outras.

Também se tem verificado que os canabinóides são capazes de inibir e/ou atrasar o crescimento de células de glioma em cultura, quer pela indução de apoptose, quer pela inibição da angiogénese tumoral.

Várias destas patologias têm sido exaustivamente exploradas a nível clínico para uma possível aplicação de agonistas canabinóides não psicoactivos, para atrasar/impedir o desenvolvimento da doença ou atenuar os seus sintomas.

Como o potencial terapêutico deste sistema não se esgota nestas patologias, o seu possível papel neuroprotector é também descrito para outras afecções que envolvem o sistema nervoso central, como a encefalopatia hepática e a encefalite induzida por vírus da imunodeficiência humana.

Conclusões: Os estudos citados neste trabalho indicam que alguns agonistas dos receptores canabinóides, principalmente do receptor CB1, e cada vez mais os do receptor CB2, podem ser úteis para melhorar o desenrolar terapêutico que segue um dano cerebral agudo e também para atrasar a progressão gradual de doenças neurodegenerativas e de outras patologias que acometem o sistema nervoso central.

Palavras Chave: Neuroprotecção; Canabinóides; Receptores CB1; Receptores CB2; Doenças neurodegenerativas; Hipóxia; Trauma

Abstract

Introduction: Neuroprotection is a therapeutic strategy that tries to prevent or delay the neuronal loss and thus the evolution of a disease. In contrast to symptomatic therapies, neuroprotection strategies act in pathological mechanisms underlying the clinical manifestations of disease.

Cannabinoids emerged as promising molecules in neuroprotection with clinical potential being able to reduce excitotoxicity, the influx of calcium and oxidative injury. They are also able to promote the survival of injured neuronal tissue, neurons recover from hypoxia or trauma and reduce the inflammation by acting on the glial processes that regulate neuronal survival, and to restore the blood supply to the injured area by reducing the vasoconstriction produced by several factors endothelium derived.

Objectives: Demonstrate, in the light of present knowledge, the central nervous system induced neuroprotection by activation of the endocannabinoid system. It will be briefly described the latest advances in the knowledge of cellular and molecular mechanisms by which cannabinoids may prevent / delay the degeneration, and protect the tumorigenesis of acute insults, thus providing neuroprotection in the central nervous system.

Development: Through one or more of these mechanisms, cannabinoids can provide neuroprotection in different pathologies of the central nervous system, both acute, as in head trauma or stroke, or in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, Huntington's Disease and Multiple Sclerosis, among others.

It has also been found that cannabinoids are capable of inhibiting and / or delay the growth of glioma cells in culture, either by induction apoptosis, or by inhibiting tumor angiogenesis.

Several of these diseases have been thoroughly explored in the clinical level for a possible application of non-psychoactive cannabinoid agonists to delay / prevent the development of the disease or alleviate its symptoms.

As the therapeutic potential of this system is not limited to these diseases, its possible neuroprotector role is also described for other diseases involving the central nervous system, such as hepatic encephalopathy and encephalitis induced by human immunodeficiency virus.

Conclusions: The studies cited in this work indicate that some agonists of cannabinoid receptors, mainly receptors CB1, and increasingly, those of the CB2 receptors may be useful to improve the therapeutic progress that follows an acute brain injury and to delay the graduation of neurodegenerative diseases and other diseases that affect the central nervous system.

Keywords: Neuroprotection; Cannabinoids; CB1 receptors; CB2 receptors; neurodegenerative diseases; Hypoxia; Trauma

Índice Geral

Agradecimentos.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	6
Índice Geral.....	8
Índice de Figuras.....	11
Lista de Siglas.....	12
Introdução.....	15
Objectivos e Metodologia.....	18
Conceito de neurodegeneração e neuroprotecção.....	19
Neurodegeneração.....	19
Neuroprotecção.....	21
O Sistema Endocanabinóide.....	22
Perspectiva História.....	22
A descoberta do Sistema Endocanabinóide.....	23
Síntese e degradação no Sistema Endocanabinóide.....	24
Vias de actuação dos Endocanabinóides.....	27
Neuroprotecção pelo sistema endocanabinóide.....	28

Mecanismos envolvidos na neuroprotecção por canabinóides.....	30
Efeitos anti-glutamatérgicos dos canabinóides.....	32
Redução do influxo de cálcio pelos canabinóides.....	35
Propriedades antioxidantes dos canabinóides.....	36
Propriedades anti-inflamatórias dos canabinóides.....	37
Efeitos vasculares dos canabinóides.....	40
Canabinóides e os PPAR.....	42
Canabinóides na neurodegeneração aguda.....	44
Canabinóides na neurodegeneração crónica.....	49
Doença de Huntington.....	49
Doença de Parkinson.....	52
Doença de Alzheimer.....	56
Esclerose Múltipla.....	60
Esclerose Lateral Amiotrófica.....	65
Epilepsia.....	66
Encefalite induzida por VIH.....	67
Encefalopatia hepática.....	69
Endocanabinóides e tumores no SNC.....	71

Outras patologias do SNC.....	74
Neurotoxicidade induzida por canabinóides.....	75
Conclusões e perspectivas futuras.....	76
Referências.....	78

Índice de Figuras

Figura 1.....	26
Figura 2.....	31
Figura 3.....	34
Figura 4.....	41
Figura 5.....	43
Figura 6.....	46
Figura 7.....	48
Figura 8.....	50
Figura 9.....	54
Figura 10.....	60
Figura 11.....	63
Figura 12.....	73

Lista de Siglas

Δ^9 -THC - Δ^9 -tetrahydrocanabinol

2-AG – 2- Araquidoglicerol

ACEA- araquidonoil-2-cloroetilamida

ADN- Ácido desoxirribonucleico

AEA- Anandamida/ N-araquidonoetanolamina

AVC- Acidente Vascular Cefálico

CB1- Receptor Canabinóide 1

CB2- Receptor Canabinóide 2

CBD- Canabidiol

COX-2- Ciclooxygenase 2

CREAE- encefalomielite autoimune experimental recorrente crónica

DA- Doença de Alzheimer

DH- Doença de Hungtinton

DP- Doença de Parkinson

EAE- Encefalomielite experimental autoimune

ELA- Esclerose Lateral Aminotrófica

EM- Esclerose Múltipla

ET-1- Endotelina 1

FAAH- hidrolase amida ácido gordo

GABA- Ácido gama-aminobutírico

GPR55- receptor orfão ligado a uma proteína G

VIH- Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humano

HU-210- canabinóide não selectivo

HU-211- dexamabinol

HU-308- agonista canabinóide

IL-6- Interleucina 6

JWH – 015- agonista selectivo do receptor canabinóide CB2

JWH – 133- agonista selectivo do receptor canabinóide CB2

LOX- lipooxygenase

MAGL- lipase monoacilglicerol

MAP - proteína activadora do mitogénio

MAPK- proteina-cinases activadoras do mitogénio

MK-801- antagonistas não competitivos do receptor NMDA

NAPE- N-acil fosfatidil etanolamina

NAPE-PLD- fosfolipase do tipo D

NF- κ B- fator de transcrição envolvido na indução da expressão de uma variedade de genes celulares

NMDA- N-metil D-Aspartato

NO- Óxido Nítrico

PLA2- fosfolipase A2

PPAR- Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma

SNC- Sistema Nervoso Central

SR – 141716- antagonista selectivo do receptor canabinóide CB1

SR – 144528- antagonista selectivo do receptor canabinóide CB2

TNF- α - factor α de necrose tumoral

UCM707- inibidor selectivo da captação de endocanabinóides

VDM11- inibidor da recaptção celular de endocanabinóides

VEGF- factor de crescimento endotelial vascular

WIN 55,212-2- agonista canabinóide não seletivo

Introdução

As neuropatologias que afectam com mais frequência a população portuguesa incluem o acidente vascular cerebral (AVC) isquémico e hemorrágico e doenças neurodegenerativas de origem imune, incluindo a esclerose múltipla, a doença de Parkinson e outras.

As terapêuticas disponíveis são pouco úteis numa percentagem reduzida de doentes, tornando-se imperativo a procura de novas estratégias. Alguma recuperação que possa ocorrer deve-se à plasticidade cerebral pela qual algumas regiões do cérebro assumem as funções efectuadas pelas áreas lesadas. A neurogénese e a angiogénese são outros mecanismos de recuperação possíveis, nomeadamente após o AVC.

O glutamato tem sido desde há algum tempo reconhecido como responsável por alguns dos mecanismos fisiopatológicos, mas o recurso a fármacos com capacidade de interferir com a via glutamatérgica tem-se mostrado decepcionante.

Nos anos recentes os canabinóides emergiram como alternativas atraentes ou como suplementos a outras terapêuticas, embora, no homem, a activação dos receptores canabinóides esteja associada a efeitos colaterais de natureza psicotrópica, impedimento temporário da memorização, e dependência que ocorrem através dos efeitos dos canabinóides nos circuitos do cérebro anterior (Pacher et al., 2006). O desafio actual nesta área consiste em criar estratégias que reduzam ou anulem os seus efeitos adversos nas funções cognitivas, afectivas e motoras sem atenuar os seus efeitos neuroprotectores.

Sabe-se que os tecidos dos mamíferos expressam pelo menos 2 tipos de receptores canabinóides (Pertwee, 2005), ambos acoplados a proteínas G, que são o

receptor CB1, clonado em laboratório em 1990 (Matsuda et al., 1990) e o receptor CB2, clonado em 1993 (Munro et al., 1993). Embora os receptores CB1 sejam expressos em certos tecidos e células não neuronais, por exemplo, as células imunes, eles são predominantemente encontrados nos terminais nervosos centrais e periféricos onde medeiam a inibição da neurotransmissão. Por sua vez, os receptores CB2 encontram-se principalmente nas células imunes, tendo como funções a modulação, tanto no SNC como em outras estruturas, da libertação de citocinas e a migração de células do sistema imune. Desta forma, um dos papéis comuns dos receptores CB1 e CB2 parece ser a regulação da libertação de mensageiros químicos, os receptores CB1 principalmente dos neurónios e os receptores CB2 das células do sistema imunitário. A descoberta que os tecidos de mamíferos expressam receptores dos canabinóides, foi seguida da descoberta de ligandos endógenos para esses receptores. Os 2 principais exemplos desses ligandos, os endocanabinóides, são a N- araquidonoetanolamina (anandamida) e o 2- araquidonoglicerol. Os endocanabinóides, em conjunto com os receptores canabinóides CB1 e CB2, constituem o sistema endocanabinóide.

A descoberta do sistema endocanabinóide desencadeou uma nova investigação sobre a sua função fisiológica e possível função patofisiológica. Esta investigação revelou que, em primeiro lugar, existem certas doenças nas quais os níveis de endocanabinóides, a densidade de receptores canabinóides, e/ou a eficiência da junção ligando-receptor canabinóide estão aumentadas em tecidos particulares e, em segundo lugar, que esta super-regulação do sistema canabinóide várias vezes leva à supressão de sinais e sintomas indesejados, sendo desta forma neuroprotector.

Os principais objectivos deste trabalho são sumariar as evidências de que o sistema endocanabinóide pode ser neuroprotector e considerar possíveis estratégias

pelas quais tal protecção pode ser melhor explorada na clínica. Essas estratégias consistem em modelos nos quais a protecção induzida por endocanabinóides é mimetizada pela utilização de agonistas directos dos receptores CB1 e CB2, ou nas quais é aumentada com fármacos conhecidos por atrasarem o desaparecimento dos endocanabinóides, após a sua libertação endógena, ou por induzir uma potenciação alostérica da activação dos receptores canabinóides por endocanabinóides. Alguma evidência de que o sistema canabinóide pode ser algumas vezes responsável pela produção de efeitos indesejáveis é, também, brevemente descrita.

Este trabalho começa com um rápida revisão do conceito de neurodegeneração e neuroprotecção, do sistema endocanabinóide, das acções farmacológicas dos ligandos de receptores canabinóides e dos processos pelos quais os endocanabinóides são produzidos e removidos dos seus locais de actuação; em segundo lugar, serão focados os mecanismos gerais pelos quais o sistema endocanabinóide pode promover a neuroprotecção; por fim, uma revisão sumária de algumas evidências, até à data, da neuroprotecção induzida por canabinóides nas patologias mais importantes do SNC em que a neuroprotecção pode, e deve, ser explorada.

Objectivos e Metodologia

O presente trabalho tem o objectivo de abordar as evidências recentes de que o sistema endocanabinóide está envolvido numa tarefa neuroprotectora, especificamente no sistema nervoso central, elucidando, à luz dos conhecimentos mais recentes, alguns mecanismos moleculares que lhe conferem essa acção.

A metodologia consistiu, basicamente, na procura de evidência científica recente alusiva ao sistema endocanabinóide, às suas propriedades neuroprotectoras, particularmente, no Sistema Nervoso Central. Para tal, efectuou-se uma pesquisa em bases de dados electrónicas, nomeadamente, MEDLINE (PubMed), ScienceDirect, National Guideline Clearinghouse, BMC Pharmacology, The Cochrane Library, Karger, PNAS, Bandolier entre outras, com as palavras-chave *Endocannabinoid*, *Neuroprotection* e *Central Nervous System*, associados ou não, e por vezes complementados por termos específicos.

Limitou-se a pesquisa a artigos publicados entre o ano 2000 e 2009, nas línguas inglesa e portuguesa. Incluíram-se posteriormente alguns artigos, que por valor científico ou histórico se revelaram relevantes, apesar de terem sido publicados antes do ano 2000.

Adicionalmente, foram consultados alguns livros especializados sobre o tema (Bahr M, 2004; Onaivi E.S., et al , 2006; Köfalvi A., 2008) e também alguns artigos que o Prof. Hanus, o Prof. Fernández-Ruiz e o Prof. Mechoulam, após contacto via e-mail, gentilmente disponibilisaram.

Neurodegeneração

A “neurodegeneração” é uma palavra usada comumente e cujo significado se acredita ser universalmente entendido. Ainda assim, encontrar uma definição precisa para neurodegeneração é muito mais trabalhoso do que se pode imaginar. Frequentes vezes, a neurodegeneração é apenas casualmente mencionada e discutida de forma escassa nos principais tratados de medicina e até definida de forma incompleta na maioria dos dicionários. Etimologicamente, a palavra é composta pelo prefixo “neuro-“, que designa células nervosas (ex. neurónios) e “-degeneração” que se refere, no caso dos tecidos ou órgãos, a um processo de perda de estrutura ou função. Desta forma, no sentido estrito da palavra, a neurodegeneração corresponde a qualquer condição patológica que afecte principalmente neurónios, ou o seu revestimento de mielina. Na prática, doenças neurodegenerativas representam um grande grupo de desordens neurológicas, com expressões clínicas e patológicas heterogénicas que afectam subestruturas de neurónios em sistemas funcionais anatómicos específicos: elas iniciam-se por razões desconhecidas e progridem sem controlo.

De entre as centenas de diferentes doenças neurodegenerativas, até agora a maior parte da atenção dos investigadores tem recaído em menos de uma dezena, que incluem a Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson (DP), Doença de Huntington (DH) e a esclerose lateral amiotrófica (ELA). Muitas das doenças neurodegenerativas menos comuns ou publicitadas, embora não menos devastantes, têm sido praticamente ignoradas.

O risco mais consistente para desenvolver uma desordem neurodegenerativa, especialmente DA ou DP, é o aumento da idade. Durante o século passado, o ritmo de crescimento da população com 65 anos ou mais velha, nos países industrializados

excedeu e muito o da população em geral. Desta forma, pode ser antecipado que, durante as próximas gerações, a proporção de cidadãos idosos irá dobrar, e com isto, possivelmente, o número de indivíduos que padeçam de algum tipo de doença neurodegenerativa.

Esta previsão está no centro de preocupações crescentes na comunidade médica e política, pois pode-se facilmente prever a magnitude crescente dos encargos emocionais, físicos e financeiros nos pacientes, profissionais de saúde e sociedade, que estão relacionados com essas doenças debilitantes. Amenizando o problema está o facto de, até à data, várias fármacos aprovados, aliviarem em alguma extensão, os sintomas de várias doenças neurodegenerativas, apesar do seu uso crónico estar frequentemente associado a efeitos secundários debilitantes e nenhum parecer suspender a progressão do processo degenerativo. Em concordância com isto, o desenvolvimento de novas terapêuticas protectoras ou preventivas tem sido atrasado, pelas limitações do nosso conhecimento das causas e mecanismos pelos quais os neurónios morrem nas doenças neurodegenerativas. Apesar desta limitação, vários avanços na neurobiologia têm aproximado, mais do que nunca, o dia em que os segredos de várias doenças neurodegenerativas serão desvendadas e terapêuticas estratégicas efectivas ficarão disponíveis.

Neuroprotecção

A neuroprotecção pode ser definida como uma “intervenção farmacológica que produz benefícios duradouros por influenciar favoravelmente a etiologia ou patogénese subjacente a uma neuropatologia, atrasando e/ou evitando desta forma o aparecimento da doença ou o declínio clínico desta” (Shoulson, 1998). O objectivo das estratégias neuroprotectoras é interferir com as cascatas que provocam a disfunção neuronal ou a morte celular. Embora os episódios desencadeadores sejam diferentes, os eventos bioquímicos que provocam a morte celular são semelhantes, senão idênticos.

Em diversas circunstâncias os mecanismos de defesa endógenos podem estar sobre-activados após um insulto inicial, um fenómeno que também ocorre durante o pré-condicionamento, que inclui a activação de mecanismos de defesa anti-oxidante e a indução de neurotrofinas. De forma a terem uso como terapêutica, os agentes neuroprotectores devem activar ou manter activos esses mecanismos de defesa endógenos. Nesta perspectiva, cada vez mais os endocanabinóides aparecem como um grupo com potencial neuroprotector a ser explorado.

Perspectiva histórica do Sistema Endocanabinóide

A *Cannabis sativa* foi talvez uma das primeiras plantas a ser cultivada pelo Homem, mas ao longo da História manteve-se sempre como uma fonte de controvérsia. O seu uso remonta há mais de 8000 anos (foram encontrados restos de sementes em comida chinesa datados dessa altura). Curiosamente, os primeiros registos escritos sobre a utilização médica da cannabis foram também descobertos na China, com datação a 2727 A.C., onde são descritos os seus efeitos analgésicos e psicoactivos, não sendo no entanto usada na medicina comum, mas sim para produção de corda e tecidos. O Atarvaveda, o texto sagrado do Hinduísmo, menciona igualmente o uso da cannabis para propósitos médicos na Índia entre 1200 e 800 A.C.. Acredita-se que a cannabis sativa foi introduzida na Europa pelos Sítios, tal como mencionado por Heródoto em 430 A.C. Na Roma e Grécia antigas era usada com fins medicinais, e para confecção de roupa e velas para os barcos. A Europa medieval tomou conhecimento da popularidade da cannabis na Ásia por Marco Polo. Mais tarde, a cannabis foi usada principalmente na medicina inglesa. Numa publicação de 1859, J. R. Reynolds descreveu 22 casos onde extractos de *Cannabis indica* foram utilizados (Reynolds, 1859). Ele concluiu que a *Cannabis indica* tinha uma acção benéfica em diversas doenças como a “insanidade incipiente pós febre amarela”, “congestão cerebral intensa” e meningite, mas não tinham qualquer efeito em “melancolia religiosa temporária e recorrente”, dor do tipo ciático e epilepsia. Até mesmo a Rainha Victória viu ser-lhe prescrita cannabis pelo seu médico em 1890. Consequentemente, a cannabis foi declarada inofensiva e legalizada em 1901. No entanto, em 1925, a Convenção de Genebra incluiu a cannabis na lista de drogas perigosas e ilícitas.

A descoberta do Sistema Endocanabinóide

Embora as culturas orientais tenham vindo a usar a marijuana com propósitos médicos por séculos, as culturas ocidentais apenas recentemente começaram a reconhecer o potencial terapêutico da marijuana. Os primeiros benefícios médicos observados consistiram na sua utilização como anestésico e no glaucoma (por reduzir a pressão intraocular), mas os seus mecanismos fisiológicos e moleculares subjacentes eram desconhecidos.

O primeiro composto isolado derivado de canabinóides foi o cannabiol, encontrado no extrato de óleo vermelho de marijuana há mais de um século, e por volta de 1930, a sua estrutura química foi elucidada (Pertwee, 2005).

Em 1964, Gaoni e Mechoulam descreveram a estrutura do Δ^9 -THC. Em 1988 Howlett et al. descrevem o primeiro receptor canabinóide, dando-lhe, em 1992, o nome de receptor CB1 (Howlett et al., 1992). No ano seguinte, um outro receptor dos canabinóides, o receptor CB2, foi identificado, mas a sua distribuição foi atribuída maioritariamente aos tecidos imunitários (Munro et al., 1993). É importante salientar que ambos os receptores canabinóides são receptores do tipo proteínas G com um domínio transmembranar séptuplo do tipo da rodopsina. Devane et al., descrevem em 1992 o primeiro ligando canabinóide endógeno, a araquidonoetanolamina ou anandamida, o que foi seguido pela descoberta da 2-araquidonilglicerol (2-AG) descrito por 2 laboratórios independentes no mesmo ano (Mechoulam et al., 1995). Como se pode indagar pelo seu nome, ambos os ligandos são derivados do ácido araquidónico.

Existem evidências da existência de outros receptores canabinóides, tais como o receptor “não CB1, não CB2” assim como um receptor orfão ligado a uma proteína G, denominado GPR55 (Baker et al., 2006).

Após a ligação de um ligando ao receptor CB1, vários mecanismos de sinalização intracelular são activados. Os receptores canabinóides foram descritos como sendo capazes de inibir a adenilciclase (Childers, 2000), inibir os canais de Ca^{2+} ligados à voltagem, principalmente do tipo N- e P/Q (Felder et al., 1993), activar proteínas-quinases activadoras do mitogénio (MAPKs) (Brandes et al., 2002) e activar canais rectificadores da entrada de potássio (Vasquez et al., 2003).

Síntese e degradação dos endocanabinóides

A AEA pertence a um grupo de derivados dos ácidos gordos, as N-acil etanolaminas. A AEA é sintetizada dos fosfolípidos da membrana, num processo com duas etapas, primeiro uma cadeia ácido gordo é transferida numa maneira dependente de Ca^{2+} de um fosfolípido para uma fosfatidil etanolamina, produzindo uma N-acil fosfatidil etanolamina (NAPE). A NAPE é subsequentemente hidrolisada por uma fosfolipase do tipo D (NAPE-PLD), uma fosfodiesterase, para formar a AEA (Okamoto et al., 2004). Uma maneira um pouco diferente de produzir AEA a partir da NAPE é pela conversão, via fosfolipase A2 (PLA2) e uma lisofosfolipase D (Sun et al., 2004). A síntese de AEA é acompanhada pelo aumento de produção de outras N-acil etanolaminas que demonstram ter uma afinidade muito baixa ou inexistente para os receptores dos canabinóides, apesar de possuírem actividade biológica (Fowler, 2007).

A síntese de 2-AG é diferente da de AEA, tanto nas moléculas precursoras como nas enzimas envolvidas. Algumas vias que foram descritas são a hidrólise do sn-araquidonil por lipases selectivas do diacilglicerol (Lambert e Di Marzo, 1999) e a conversão do lisofosfatidilinositol (LysoPI) pela fosfolipase C (Lambert e Di Marzo, 1999). Se estas são ou não as únicas vias de síntese para o AEA e o 2-AG permanece desconhecido.

Tanto AEA e 2-AG são substratos para a enzima ligada à membrana, a hidrolase amida ácido gordo (FAAH). A importância desta enzima na hidrólise de AEA foi claramente demonstrada em ratos “knock out” para FAAH, onde foram encontrados níveis de AEA cerca de 15 vezes superiores ao normal (Cravatt et al., 2001). Outras enzimas como a ciclooxigenase 2 (COX-2), a lipooxigenase (LOX), e as enzimas oxidativas do citocromo P450 foram também descritas como capazes de degradar o AEA (Fowler, 2007), embora a importância fisiológica destas vias ainda não tenha sido totalmente elucidada.

Apesar da 2-AG ser capaz de ser substrato para a FAAH, admite-se que a enzima responsável pela sua degradação, no cérebro, seja a lipase monoacilglicerol (MAGL) (Dinh et al., 2002). A MAGL é uma serina hidrolase e os produtos resultantes da hidrólise catalizada por MAGL do 2-AG são o ácido araquidónico e o glicerol. A MAGL é mais selectiva nas suas acções sobre os endocanabinóides, uma vez que hidrolisa o 2-AG, mas não as etanolaminas AEA e a PEA (Dinh et al., 2002).

A identificação das enzimas responsáveis pela degradação dos canabinóides levou à síntese e caracterização de vários compostos que inibem a degradação dos endocanabinóides. O valor desses compostos recai na capacidade de potenciarem os efeitos dos endocanabinóides libertados e poderá ser explorado para potenciar as suas acções terapêuticas dos canabinóides.

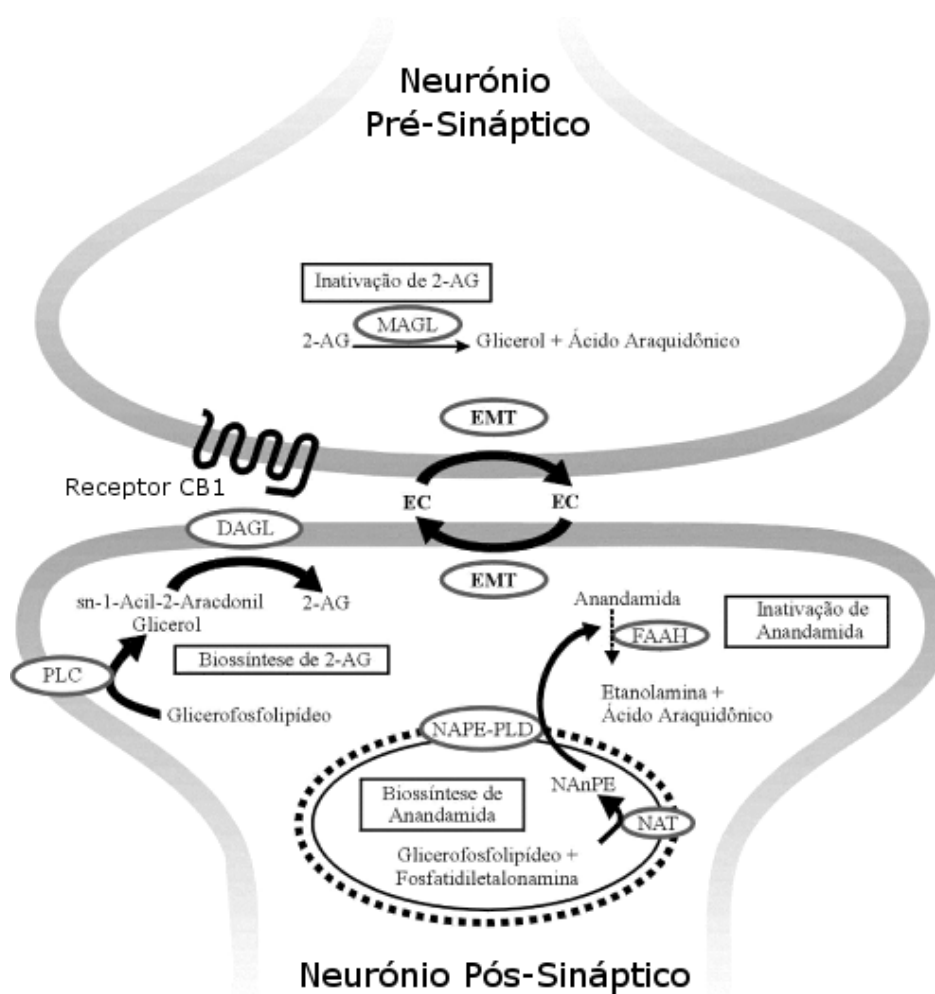


Figura 1: Mecanismos de actuação do sistema endocanabinóide (adaptado de Godoy-Matos et al., 2006)

Via de actuação dos endocanabinóides

Um fenómeno conhecido como supressão da inibição induzida por despolarização é conhecido dos neurofisiologista, há alguns anos (Alger, 2002). É uma forma de sinalização retrógada, a partir dos neurónios pós-sinápticos para trás, para as células inibitórias que os inervam, e é particularmente proeminente no hipocampo e no cerebello.

Diversos estudos sugeriram que os endocanabinóides estejam envolvidos na modulação rápida da transmissão sináptica no SNC através de um sistema de sinalização retrógado, provocando efeitos na libertação de neurotransmissores quer excitatórios quer inibitórios.

Neuroprotecção pelo sistema endocanabinóide

Os canabinóides naturais, sintéticos e endógenos têm sido propostos como substâncias neuroprotectoras em vários modelos de neurotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (Guzmán et al., 2001). Desta forma, durante a última década, um volume considerável de trabalhos acumulou evidências para assumir que o sistema endocanabinóide tem um papel na protecção contra danos cerebrais agudos (traumatismo craneano e AVC) ou crónicos (Doença de Huntington e doença de Parkinson, entre outras).

Por outro lado, a activação de diferentes elementos do sistema endocanabinóide, como parte de uma resposta endógena protectora, tem sido documentada em diferentes paradigmas experimentais de neurodegeneração, embora com resultados variáveis, dependendo da idade, espécies, tipo e severidade do insulto e mecanismos de morte celular activados (Mechoulam et al, 2002; van der Stelt et al., 2002). Apesar destes estudos demonstrarem que os danos neuronais são acompanhados pelo aumento da produção de endocanabinóides, outros autores não encontram esta resposta (van der Stelt et al., 2001). Em 2001, Hansen e os colaboradores descreveram um aumento nos níveis de anandamida e dos seus precursores fosfolipídicos, mas não do 2-araquidonoil glicerol (2-AG), durante degeneração aguda em cérebro de rato neonatal. No entanto, Panikashvili et al. (2001) mostraram que 2-AG é produzido massivamente em cérebro de rato pós-traumatismo craneano fechado. Além disso, descobriram que este endocanabinóide tem efeitos neuroprotectores, traduzidos na redução do edema e volume de enfarte, e por melhoria da recuperação clínica, após ter sido administrado aos animais. Resultados similares, aumento do AEA sem alterações no 2-AG, foram

encontrados por Marsicano et al. (2003) num modelo de excitotoxicidade em rato induzida por cainato.

Que o aumento descrito na produção de endocanabinóides durante a neurodegeneração é parte de uma resposta endógena, pode também ser concluído da observação de que o bloqueio da captação de endocanabinóides, com UCM707, aumentou a protecção contra convulsões induzidas por cainato em ratos (Marsicano et al., 2003). No entanto, este ponto é também controverso uma vez que, embora van der Stelt et al. (2001) descrevam protecção após administração exógena de AEA num modelo neonatal de excitotoxicidade secundária, estes autores não encontraram nenhum aumento dos níveis de AEA ou 2-AG e, concomitantemente, qualquer efeito de outro inibidor da captação, o VDM11, no volume da lesão.

Existem também evidências de que os subtipos de receptores canabinóides são induzidos nas células nervosas em resposta à agressão e/ou inflamação (Nagayama et al., 1999; Hansen et al., 2001; Benito et al 2003).

No que se refere aos receptores CB2, um subtipo de receptor que está maioritariamente ausente do cérebro em condições normais, centrando-se numa discreta população de células perivasculares, identificadas como macrófagos perivasculares (Núñez et al., 2004,. estudos demonstraram indução deste subtipo de receptor em várias patologias (Benito et al., 2003; Fernández-Ruiz et al., 2006). Este efeito ocorre em células da glia activadas, principalmente na microglia que rodeia as placas senis, em amostras de cérebro humano com DA, o que pode indiciar que os receptores CB2 têm um papel na redução do impacto neurodegenerativo nos neurónios ou, pelo contrário, promovem eventos citotóxicos.

Em contraste com as propriedades protectoras dos canabinóides em células nervosas não transformadas, estes compostos são também capazes de desencadear

apoptose em células nervosas transformadas (glioma C6, astrocitoma humano U373MG e em células de neuroblastoma N18TG12 de rato) *in vitro* (Guzmán et al., 2001). Em adição, os canabinóides foram descritos recentemente como capazes de inibir a angiogénese, o que representa um processo central na tumorigénese) e esses efeitos anti-proliferativos representam uma nova utilidade potencial destes compostos no tratamento futuro do cancro (Blázquez et al., 2003).

Mecanismos envolvidos na neuroprotecção por canabinóides

Os mecanismos moleculares subjacentes às propriedades neuroprotectoras dos canabinóides são bastante diversos e, frequentemente, complementares. Estes incluem alguns eventos não mediados por receptores de canabinóides (antagonismo de receptores NMDA, propriedades antioxidantes) e outras, que são definitivamente mediadas quer por receptor CB1 quer CB2, incluindo a sua capacidade para:

1. Modulação, via receptores CB1 pré-sinápticos, das transmissões excitatórias glutamatérgicas e plasticidade sináptica;
2. Estimular a acção do GABA;
3. Modulação das respostas imunes e da libertação de mediadores inflamatórios via receptores CB1, CB2 e não CB1/CB2, localizados nos neurónios, astrócitos, microglia, macrófagos, neutrófilos e linfócitos.
4. Activação de vias de sinalização citoprotectoras;
5. Modulação da excitabilidade e da homeostase do Ca^{2+} , através de acções sobre os canais do Ca^{2+} , K^{+} e Na^{+} , receptores NMDA e;
6. Melhorar o suprimento sanguíneo ao cérebro lesionado.

Existem processos adicionais também influenciados pelos canabinóides, tais como a melhoria da utilização da glicose – Nagayama et al. (1999) descrevem que os canabinóides endógenos protegem neurónios corticais em cultura, da privação de oxigénio e glicose de uma maneira independente da activação dos receptores CB1 e CB2 -, ou alternativamente, pela produção de corpos cetónicos – os quais, produzidos pelas células da glia, podem substituir a glicose, como o recurso major do metabolismo energético neuronal na isquémia (Witting et al., 2005).

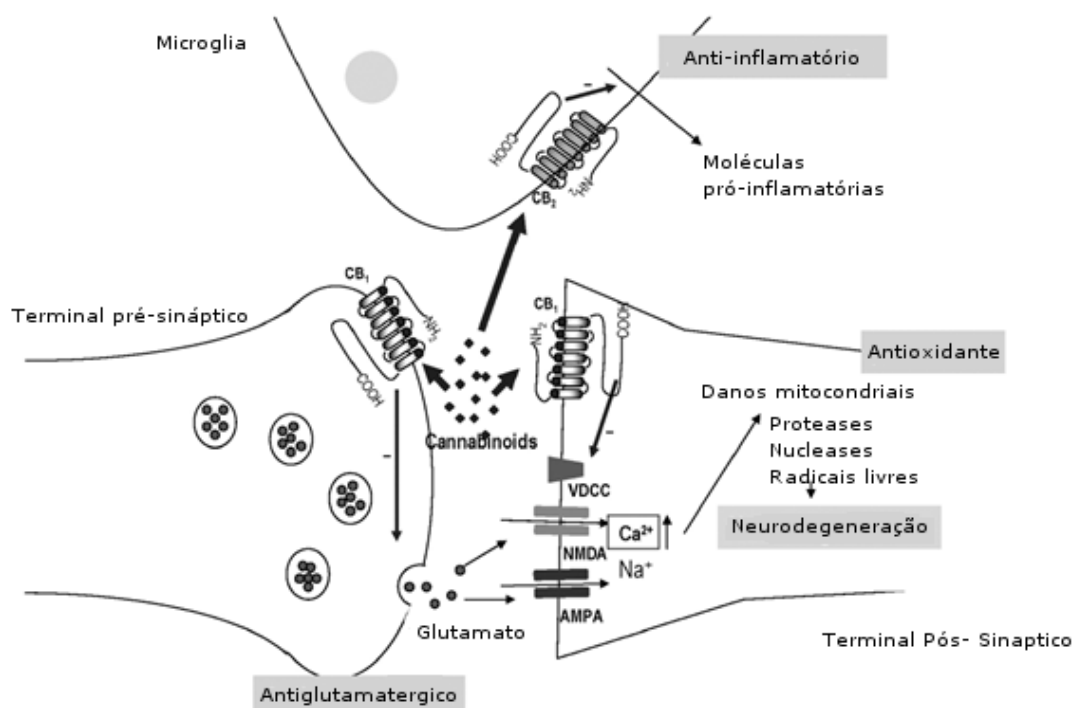


Figura 2: Esquema sumário dos mecanismos neuronais e da glia pelos quais os canabinóides promovem neuroprotecção nas doenças neurodegenerativas (adaptado de Eva de Lago et al., 2007)

Efeitos anti-glutamatérgicos dos canabinóides

A excitotoxicidade, reflectida em níveis extracelulares excessivos de glutamato e hiperactivação de receptores de glutamato, principalmente o subtipo de receptor NMDA, que por sua vez promove o influxo de Ca^{2+} e consequente disrupção da homeostase do cálcio intracelular, é um evento crítico em neurodegeneração aguda ou crónica (Doble, 1999). É aceite que uma elevação mantida da concentração de Ca^{2+} intracelular induz apoptose, em parte por activar a calcineurina que, por sua vez activa a caspase 3 pró-apoptótica, através da proteína Bcl-2 e do citocromo c (Polster e Fiskun, 2004).

Os efeitos anti-glutamatérgicos dos agonistas canabinóides são, na sua maioria, exercidos pela inibição da libertação de glutamato, um facto que tem sido largamente demonstrado em culturas de neurónios de numerosas regiões cerebrais e também *in vivo*, através a activação de receptores CB1 localizados pré-sinápticamente em terminais glutaminérgicos (Schlicker et al., 2001). Este efeito inibidor dos agonistas canabinóides na libertação de glutamato é revertido por antagonistas selectivos para os receptores CB1, tais como o SR-141716 (Grundy et al., 2001; van der Stelt et al., 2002). Além disso, o antagonismo por si só potenciou a excitotoxicidade em ratos injectados com cainato (Marsicano et al., 2003) e aumentou o volume da lesão num modelo de rato de DH, originado por injecções locais de inibidor do complexo II, o malonato (Lastres-Becker et al., 2003). No entanto, van der Stelt e os seus colaboradores, em 2001 descreveram ausência de efeitos do SR-141716 por si só, tendo também sido descrito por Hansen et al., em 2002, um efeito neuroprotector, que foi contrariado pela co-administração de agonistas canabinóides.

Por outro lado, alguns canabinóides específicos, como o dextrabinol (HU-211) e a AEA são também capazes de actuar directamente nos receptores glutamatérgicos NMDA. O caso do HU-211 representa, juntamente com o canabidiol (CBD), uma opção interessante porque o HU-211 tem uma estrutura canabinóide, mas não é capaz de ligar os receptores canabinóides (Gundry et al., 2001). A sua actividade neuroprotectora decorre da sua capacidade para actuar directamente no sistema do glutamato, bloqueando o receptor NMDA num local perto, mas distinto, dos antagonistas não competitivos, como o MK-801 e a fenciclidina, e do local de reconhecimento para o glutamato ou glicina (Gundry et al., 2001). Baseado nesta capacidade de antagonismo, o HU-211 reduz directamente o influxo de Ca^{2+} mediado pelo receptor NMDA para os neurónios. No entanto, também produz neuroprotecção porque é um antioxidante e reduz os níveis de factor α de necrose tumoral (TNF- α) (Gundry et al., 2001). O resultado desses mecanismos neuroprotectores activados por HU-211 é uma melhoria na função motora e memória, em associação com uma redução do edema e destruição da barreira hematoencefálica em ratos sujeitos a traumatismo craneano fechado. A AEA também demonstrou interagir directamente com os receptores NMDA em amostras de tecido do córtex, cerebelo e hipocampo, produzindo dessa forma uma potenciação das respostas ao cálcio induzidas pelo NMDA (Hampson et al., 1998). No entanto, isto ocorreu apenas na presença do antagonista dos receptores CB1, SR-141716. Esta capacidade seria independente dos seus efeitos neuroprotectores mediados pela activação de receptores canabinóides (ex. redução de influxo de Ca^{2+} mediada por receptores canabinóides e efeitos anti inflamatórios e vasculares).

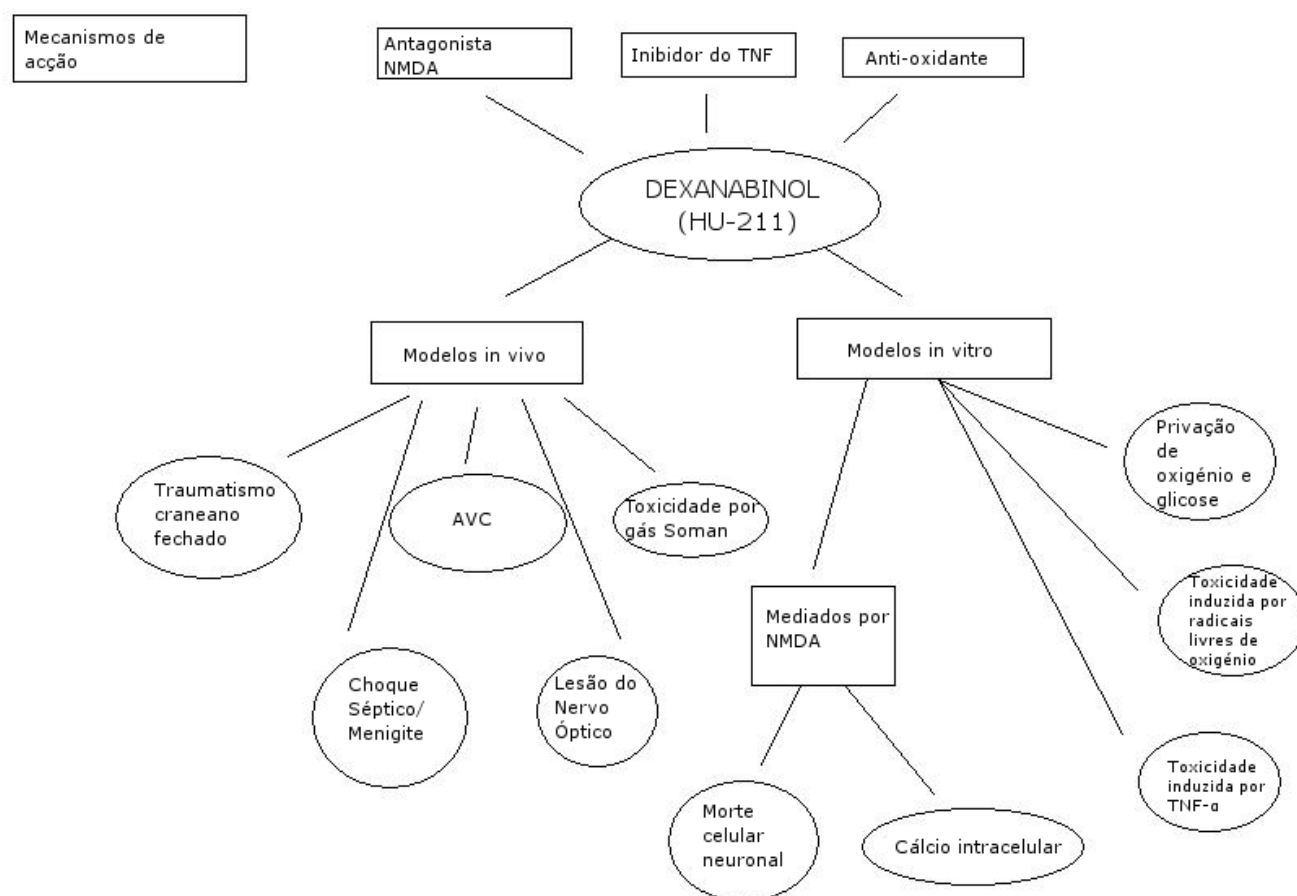


Figura 3: Efeitos do Dexamabinol (HU-211) (adaptado de Shohami et al., 2000)

Existem também evidências que sugerem que um dos mecanismos de neuroprotecção desencadeados por bloqueio do receptor NMDA implicaria a potenciação da transmissão de GABA. A capacidade, descrita por Romero et al., em 1998, dos canabinóides serem capazes de aumentar a transmissão inibitória mediada por GABA em algumas regiões tais como os gânglios basais seria a favor da importância crítica do desequilíbrio entre inervação inibitória e estimulatória durante o processo de morte transneuronal retardada. Os agonistas canabinóides, ao inibirem a libertação de glutamato e/ou aumentarem a presença de GABA nas sinapses – presumivelmente por bloquearem a recaptação de GABA – podem rectificar este desequilíbrio, desta forma

atrasando/evitando a morte transneuronal que ocorre em regiões específicas, como a substância nigra pars reticulata.

Redução do influxo de cálcio pelos canabinóides

A excitotoxicidade causa hiperactivação dos receptores de glutamato, que resulta numa acumulação intracelular de níveis citotóxicos de Ca^{2+} , o que activa numerosas cadeias destrutivas envolvendo calpainas, caspases e outras proteases, proteínas cinases, lipases, endonucleases, NO sintetase, espécies reactivas de oxigénio e outras. Além disso, canais iónicos sensíveis à voltagem são activados em resposta à despolarização associada ao influxo de Ca^{2+} induzido por NMDA e níveis intracelulares elevados deste e de outros iões. Os agonistas canabinóides são capazes de fechar esses canais iónicos sensíveis à voltagem, reduzindo desta forma a grande corrente de Ca^{2+} e a superactivação das vias destrutivas, o que diminui o grau de morte neuronal e produz neuroprotecção (Grundy et al., 2001; Mechoulam et al., 2002; Fowler, 2007). Esses efeitos seriam exercidos preferencialmente através da activação de receptores CB1 que, neste caso, estariam localizados na pós – sinapse (em neurónios contendo receptores NMDA de glutamato), em contraste com aqueles envolvidos na inibição da libertação de glutamato de localização pré-sináptica. Vários tipos de canais de cálcio, nomeadamente os do tipo N, L e P/Q estão acoplados aos receptores CB1, e são inibidos pela activação desses receptores (Pan et al., 1996). Além disso, à AEA tem sido atribuída a capacidade de interacção directa com os canais de Ca^{2+} do tipo T (Chemin et al., 2001). Os agonistas canabinóides também afectam as correntes de K^+ através da abertura de canais rectificadores de K^+ , um efeito que também poderá fazer parte da acção neuroprotectora dos canabinóides (Vasquez et al., 2003).

Este efeito directo de diminuição de Ca^{2+} pelos agonistas canabinóides ajudaria à redução deste íão produzida indirectamente como consequência dos efeitos anti-glutamatérgicos destes compostos, os quais, através da redução da libertação de glutamato ou por bloqueio dos receptores NMDA, resultariam na redução da entrada celular de Ca^{2+} . Como consequência desta inibição directa e/ou indirecta do influxo de Ca^{2+} produzida pelos agonistas canabinóides, reduziriam a activação de cascatas citotóxicas dependentes de Ca^{2+} , prevenindo desta forma danos neuronais. Em suporte desta hipótese, vários estudos demonstraram que o aumento do influxo de Ca^{2+} produzido por diferentes estímulos neurotóxicos, incluindo NMDA e outras excitotoxinas, foi reduzido por diferentes canabinóides (Shen et al., 1998; Hampson et al., 1998; van der Stelt et al., 2001; Zhuang et al., 2005), e que a maioria desses efeitos foram contrariados pelo SR-14176, sugerindo o envolvimento da activação de receptores CB1 (Shen et al., 1998; Hampson et al., 1998; Zhuang et al., 2005).

Propriedades antioxidantes dos canabinóides

O stress oxidativo inicia-se quando o equilíbrio normal entre eventos oxidativos e mecanismos antioxidantes endógenos (ex. enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase, glutationa e pequenas moléculas antioxidantes como as vitaminas A, C, E e ubiquitina) é desregulado, sendo responsável por danos secundários em condições de neurodegeneração aguda (Chen et al., 2000). Alguns canabinóides clássicos, como o CBD, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabinol, nabilona, levonantradol, dexanabinol e outros, que contêm grupos fenólicos na sua estrutura química, são capazes de diminuir o stress oxidativo (Marsicano et al., 2002). Esses canabinóides são compostos antioxidantes potentes contra espécies reactivas de

oxigénio, formadas durante o metabolismo isquémico ou em várias patologias cerebrais crónicas, nas quais o stress oxidativo representa um evento crítico na sua patogénese. No entanto, deve ser realçado que essas propriedades antioxidantes de alguns canabinóides específicos devem ser certamente independentes do receptor CB1 (Marsicano et al., 2002; Hampson et al., 1998; Chen et al., 2000). Hampson et al. (1998), usando culturas de neurónios corticais de rato expostos a níveis tóxicos de glutamato, verificou que tanto o Δ^9 -THC como o CBD, providenciam neuroprotecção através um mecanismo independente do receptor CB1, presumivelmente baseado nas propriedades antioxidantes de ambos os compostos, que são quase equivalentes.

O canabidiol (CBD) é um canabinóide derivado de plantas que apresenta características farmacológicas interessantes e não psicoactivo, porque não se liga significativamente aos receptores CB1. No entanto, exibe uma potência antioxidante comparável e até superior, à dos antioxidantes clássicos da dieta, tais como o ascorbato e o α -tocoferol (Hamelink et al., 2005).

Propriedades anti-inflamatórias dos canabinóides

Outro mecanismo potencialmente relacionado com várias patologias cerebrodegenerativas agudas e crónicas é a activação de processos inflamatórios. A inflamação pode induzir ou agravar danos cerebrais através do aumento da libertação de mediadores neurotóxicos, tais como TNF- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6, eicosanóides, NO e espécies reactivas de oxigénio. Em alternativa, pode aumentar a vulnerabilidade desse estímulo citotóxico. Esses factores são, na sua maioria, produzidos por células da glia (principalmente microglia reactiva) e impactam nos neurónios para induzir neurodegeneração. Por exemplo, a IL-6 e o TNF- α demonstraram promover

desmielinização, trombose, infiltração leucocitária e disrupção da barreira hematoencefálica (Walter et al., 2004). Em contraste, células da glia (principalmente astrócitos) são capazes de produzir factores pró-sobrevivência que desempenham um papel na neuroprotecção (Aloisi F., 1999). Ambos os fenómenos ocorrem na isquémia, trauma, DP, DH, DA e outras doenças. Para mais, a inflamação pode também provocar neurodegeneração através da activação de respostas autoimunes contra antigénios cerebrais, como acontece no caso da EM e outras doenças desmielinizantes (Baker et al., 2007). Os agonistas dos canabinóides são capazes de reduzir a inflamação que ocorre nessas doenças. Este efeito é causado possivelmente por efeitos locais nas células da glia, exercido quer pela redução da libertação de factores citotóxicos quer pelo aumento de produção de moléculas pró-sobrevivência. Isto é consistente com a ideia que o sistema de sinalização endocanabinóide desempenha uma papel crucial nas células da glia tanto em indivíduos normais como em condições patológicas (Grundy et al., 2001; Walter et al., 2004).

O potencial anti-inflamatório dos agonistas canabinóides nas doenças neurodegenerativas, tem sido alvo de vários estudos que revelaram efeitos anti-inflamatórios potentes dos agonistas selectivos dos receptores CB1 (araquidonoil-2-cloroetilamida, ACEA) ou dos receptores selectivos CB2 (JWH-133, JWH-015) e também dos agonistas canabinóides não selectivos. Em parte, esta capacidade é consequência de um efeito de protecção de morte sobre os astrócitos e oligodendrócitos dos canabinóides, o que também é benéfico para os neurónios. Por outro lado, os agonistas canabinóides, possivelmente por activarem os receptores CB1, modulam a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células da glia, em particular IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-12 que desempenham um papel major no desenvolvimento de danos em condições neurodegenerativas/neuroinflamatórias, como as que ocorrem na isquémia

cerebral (Grundy et al., 2001). De interesse particular é o efeito inibidor dos agonistas canabinóides na produção de TNF- α , por ser este factor um contribuinte major para a fisiopatologia do dano cerebral. Esses efeitos inibitórios podem ser exercidos pelo impedimento da activação do factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), que está envolvido na indução da expressão genética das citocinas. O HU-211, que não se liga aos receptores canabinóides inibiu este factor de transcrição (Klein et al., 2000). Outro mediador importante relacionado com a inflamação é o NO, produzido em resposta à toxicidade mediada imunitariamente, desempenhando um papel na neurodegeneração. As estratégias que reduzem a expressão da forma induzível ou neuronal da NO sintetase podem ser neuroprotectoras. Neste sentido, os agonistas canabinóides foram descritos como capazes de inibir a libertação de NO na microglia, astrócitos, neurónios e macrófagos (Waksman et al, 1999).

As células da glia podem também segregar vários factores tróficos, como o factor de crescimento transformante β , a citocina anti-inflamatória IL-10, e neurotrofinas, que têm o potencial de resgatar neurónios danificados, e cuja produção pode ser potenciada por canabinóides. Molina-Holgado et al. (2003) descreveram que o antagonista do receptor IL-1, uma importante citocina anti-inflamatória que protege contra isquémia induzida experimentalmente, excitotoxicidade e insultos cerebrais traumáticos, é produzida em resposta à activação de receptores canabinóides em células da glia primárias cultivadas. É interessante verificar, a este propósito, que a activação de receptores canabinóides não teve este efeito em ratos “knockout” para esta citocina anti-inflamatória.

As propriedades anti-inflamatórias dos agonistas canabinóides também incluem a activação de receptores CB2, o que sugere um papel adicional para este receptor nos processos inflamatórios. Este facto reveste-se obviamente de grande interesse uma vez

que este subtipo de receptor não está envolvido nos efeitos psicotrópicos dos canabinóides. Trabalhos recentes indicam que os receptores CB2 desempenham um papel importante em alguns processos chave (ex. proliferação de células da microglia e migração em locais de lesões neuroinflamatórias) envolvidos nas fases iniciais da activação da microglia em resposta a infecção, inflamação ou dano tecidual (González-Scarano e Martin-García, 2005).

Desta forma, parece bem demonstrado que a microglia, astrócitos e oligodendrócitos respondem aos agonistas dos canabinóides, de tal forma que os efeitos benéficos desses compostos na neuroinflamação/neurodegeneração pode ser relacionado com alguns dos seguintes acontecimentos:

1. inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios;
2. potenciação da produção de factores anti-inflamatórios
3. inibição do recrutamento da microglia e
4. potenciação da sobrevivência de astrócitos e oligodendrócitos

Efeitos vasculares dos canabinóides

Alguns danos cerebrais, como os causados por enfarte ou agressões traumáticas, estão também relacionados com a libertação de vários mediadores derivados de endotélio, como a endotelina-1 (ET-1), o NO e outros, que afectam o tónus vascular local. O principal mediador é o ET-1, o qual, uma vez formado nas células endoteliais, é capaz de produzir vasoconstrição, limitando deste modo o suprimento sanguíneo para a área danificada e agravando o dano cerebral (Schinelli, 2002). Os canabinóides, em particular o 2-AG, são moduladores potentes do tónus vascular, o que é sugestivo de poderem providenciar neuroprotecção, em parte devido a esta propriedade. Na

realidade, os canabinóides contrariam a vasoconstrição induzida por ET-1, ajudando desta forma a restaurar a irrigação sanguínea para a zona cerebral lesionada (Mechoulam et al., 2002). Este efeito foi demonstrado ser exercido pela activação de receptores CB1, uma vez que foi evitado pelo antagonista SR-141716 (Chen et al., 2000), o que indica que este subtipo de receptor está localizado na microvasculatura cerebral. Em adição, tal como mencionado anteriormente, os agonistas canabinóides são capazes de reduzir a produção de NO, reduzindo assim os efeitos vasculares deste outro mediador derivado do endotélio. Ambos os efeitos podem ser parte da resposta neuroprotectora providenciada por agonistas canabinóides, em particular no caso de neurodegeneração aguda como ocorre no enfarte e no traumatismo craneano.

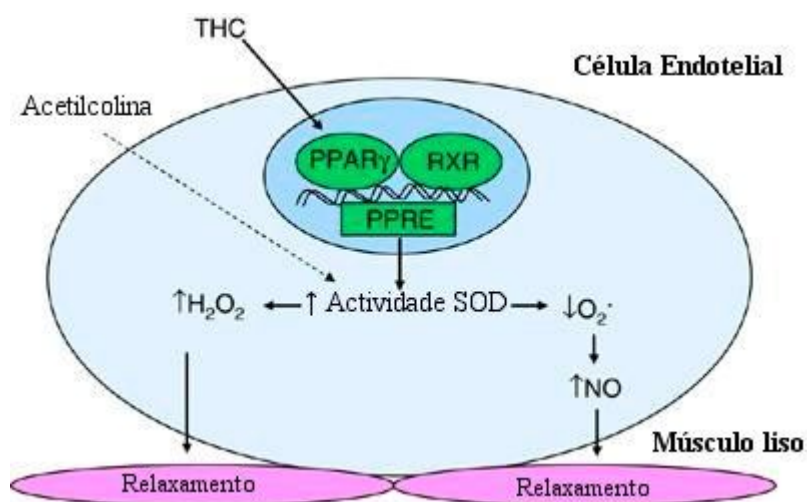


Figura 4: Efeitos de relaxamento vascular endotelial por acção dos canabinóides, via activação dos PPAR (adaptado de O'Sullivan, 2007)

Canabinóides e os PPAR

Os PPAR (Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma) são factores de transcrição nucleares associados à membrana pertencentes à família dos receptores nucleares. Eles exercem uma grande variedade de funções fisiológicas, entre as quais um papel central na regulação do metabolismo lipídico, da homeostase da glicose e proliferação celular e apoptose. Foram também descritos como tendo capacidade anti-inflamatória. A activação do PPAR inibe a transcrição de genes pró-inflamatórios ao impedir o factor central de transcrição inflamatória, o factor nuclear κ B. Nos últimos anos, os estudos experimentais em modelos de isquémia cerebral revelaram um papel crucial dos PPAR na atenuação da neuroinflamação e morte neuronal do CNS lesionado. Uma vez que os PPAR inibem a transcrição de genes pró-inflamatórios, os seus efeitos neuroprotectores podem ser atribuídos á inibição das citocinas dependentes de NF- κ B libertadas no cérebro lesionado (IL-1, IL-8, TNF). A interacção funcional entre os canabinóides e os PPAR foi primeiramente descrita com um derivado da anandamida, no entanto o Δ 9-THC já foi descrito como capaz de activar o PPAR γ em linhas celulares humanas provocando um relaxamento de vasos isoladas (O'Sullivan et al., 2007). Por outro lado, a anandamida tem propriedades anti-inflamatórias, que são tanto dependentes de receptores canabinóides como independentes destes. Rockweel e Kaminski (2004) demonstraram que a anandamida inibe a secreção da IL-2, uma citocina pró-inflamatória, de uma maneira independente de receptores canabinoides. O'Sullivan et al., 2007 demonstraram que o Δ 9-THC é capaz de provocar relaxamento em artérias isoladas. Esta resposta é dependente da produção de NO e peróxido de hidrogénio (H₂O₂), e da actividade da superóxido dismutase (SOD). Um outro dado, de interesse particular na lesão cerebral traumática é a descoberta que o 2-AG é capaz de

suprimir a citocina pró-inflamatória IL-2 através da sinalização via PPAR γ , capacidade independente da sua ligação a receptores canabinóides (Rockwell et al., 2006).

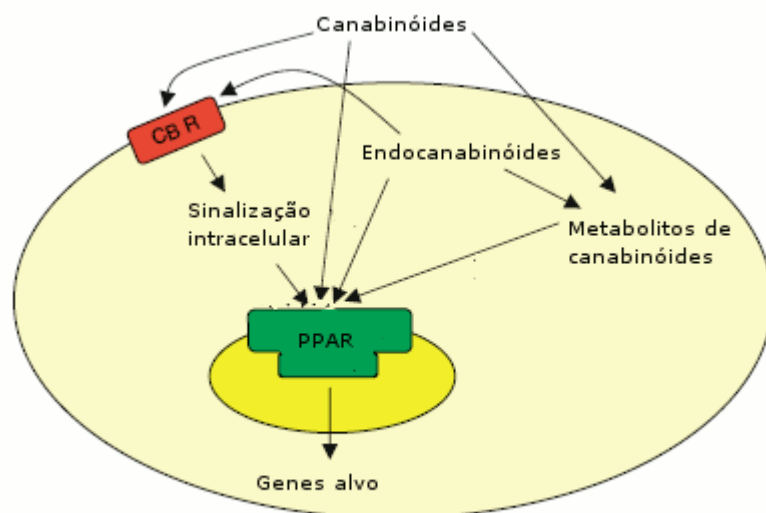


Figura 5: Mecanismos potenciais das interações canabinóides/PPAR (adaptado de O’Sullivan, 2007)

Esta é uma nova área de investigação, com muito ainda para explorar, e que se espera que conduza a novas descobertas, que possam mudar a maneira como pensamos sobre os canabinóides, e particularmente, a sua relação com os PPAR.

Canabinóides na neurodegeneração aguda

O Sistema Nervoso Central é muito vulnerável à isquémia induzida por traumatismo ou acidente vascular. A morte celular durante estes insultos agudos é predominantemente necrótica e caracterizada por uma perda da integridade da membrana plasmática, o que leva a eventos inflamatórios subsequentes. A apoptose, caracterizada pela activação de um conjunto endógeno de enzimas destrutivas, denominadas caspases, pode também ocorrer durante degeneração aguda, mas sempre como um evento secundário. Infelizmente, a neurodegeneração causada por isquémia ou por trauma não tem no momento actual um tratamento clínico satisfatório, apesar de múltiplos estudos clínicos com recurso a múltiplos compostos, incluindo os canabinóides.

O tratamento com canabinóides *in vivo* reduziu o tamanho do enfarte e edema associado, com melhoria funcional (redução dos défices neurológicos) em modelos animais que reproduzem degeneração aguda em roedores com isquémia cerebral global (temporária) ou focal (permanente ou temporária) induzida pela oclusão da carótida e artérias vertebrais ou vasos intracranianos, respectivamente (Grundy et al., 2001; Mechoulam et al., 2002). A neuroprotecção pelos canabinóides foi também comprovada *in vitro* utilizando neurónios cultivados sujeitos a hipóxia e/ou privação de glicose, ou expostos a estímulos excitotóxicos, onde os canabinóides aumentaram a sobrevivência dos neurónios. Por exemplo, agonistas dos canabinóides protegeram de excitotoxicidade neurónios do hipocampo de rato cultivados (Shen et al., 1998). Nagayama et al. (1999) descreveram que o WIN – 55,212-2 protegeu *in vitro*, e também num modelo *in vivo* de danos isquémicos. A anandamida e a 2-AG foram também descritos como agentes protectores de neurónios corticais de isquémia de rato *in vitro*. Em outros estudos com

recurso a modelos *in vivo*, o 2-AG foi administrado a ratos sujeitos a traumatismo craneano fechado, tendo sido documentados uma redução significativa do edema cerebral e volume de enfarte, melhor recuperação clínica e diminuição da morte celular no hipocampo (Panikashvili et al., 2001). É interessante relatar que os efeitos do 2-AG, como um agente neuroprotector, foram potenciados por diversos 2-acil-glicerois, que estão presentes no cérebro, mas que não se ligam a receptores canabinóides. Foi assumido que este efeito, denominado efeito “entourage”, pode ser produzido pelo bloqueio parcial dos mecanismos envolvidos na inactivação do 2-AG (captação e hidrólise) (Fowler et al., 2007).

Exceptuando uns poucos casos (Nagayama et al., 1999), a maioria dos efeitos neuroprotectores de diversos agonistas canabinóides foram atenuados por SR-141716, apoiando, deste modo, uma mediação dos receptores CB1, o que pode também ser concluído pelos estudos de Parmentier-Batteur et al. (2002). Esses autores descreveram um maior dano cerebral (aumento da área do enfarte e dos défices neurológicos) em ratos deficientes em receptor CB1 sujeitos a isquémia cerebral focal temporária. Resultados similares foram publicados por Marsicano et al. (2003) no mesmo modelo de rato “knockout”, mas sujeito a injeção de cainato. Paralelamente, num modelo neonatal *in vivo* de excitotoxicidade induzida por NMDA, o bloqueio do receptor CB1 reduziu o tamanho do enfarte e o número de neurónios corticais degenerativos (Hansen et al., 2002).

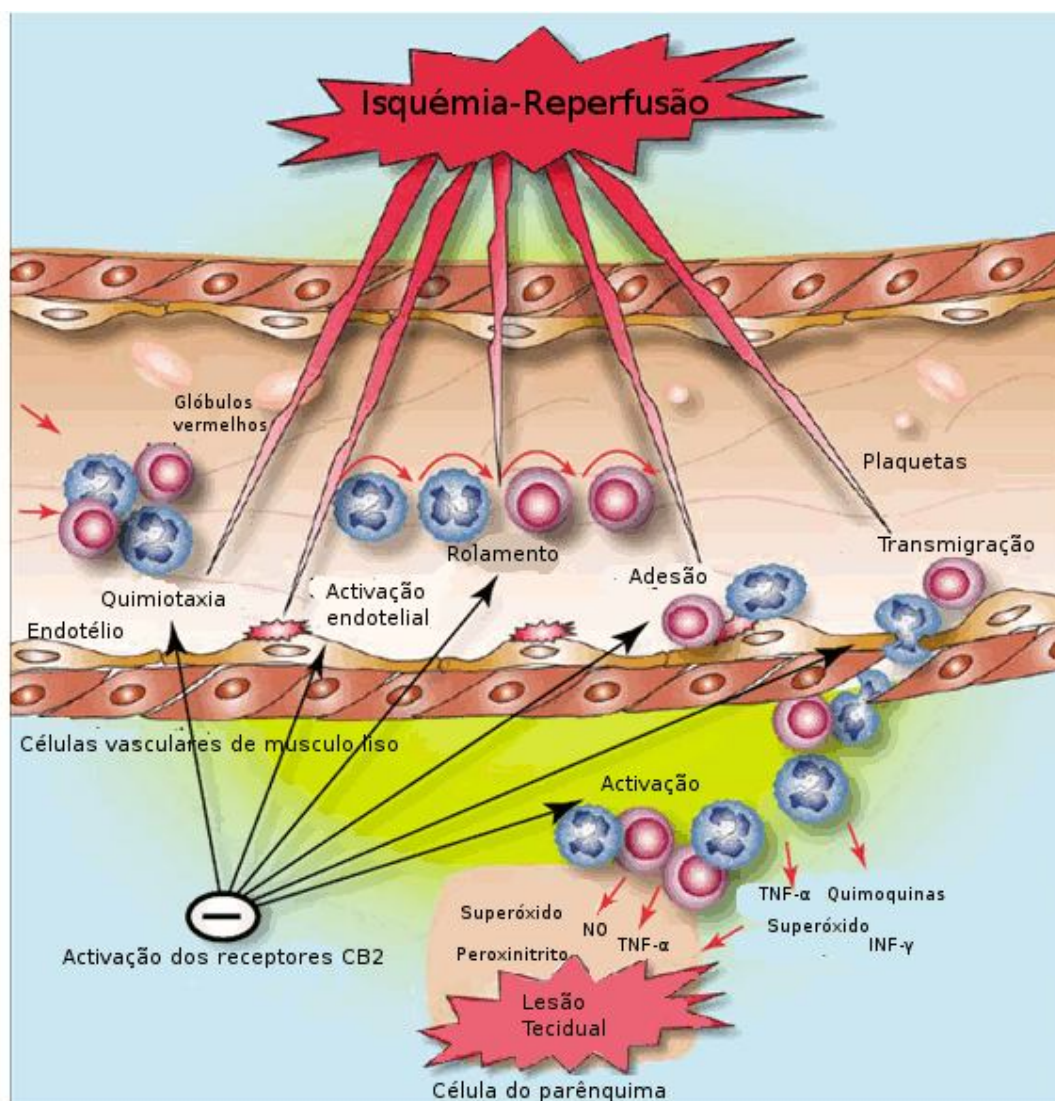


Figura 6: Mecanismos da neuroprotecção induzida por CB2 na isquemia/reperfusão (adaptado de Pacher et al., 2008)

Finalmente, é importante notar que, em todos estes exemplos, a capacidade neuroprotectora dos agonistas canabinóides é, provavelmente, consequência da sua capacidade de reduzir a excitotoxicidade, o stress oxidativo e/ou a inflamação, supostamente pelos mecanismos previamente explicados, que são eventos chave envolvidos, em diferentes extensões, na neurodegeneração que ocorre nessas patologias agudas.

Apesar das propriedades neuroprotectoras que os canabinóides demonstram em degeneração aguda, o desenvolvimento clínico com compostos baseados em canabinóides é ainda pobre e apenas o dexamabinol (HU-211) foi testado. Num estudo de fase II, multicêntrico, randomizado, duplamente cego e controlado com placebo, conduzido em 67 pacientes com traumatismo craneano fechado grave, o dexamabinol provou ser seguro e bem tolerado. Os pacientes tratados revelaram um pressão intracranéana/ pressão de perfusão cerebral significativamente menor, e também se verificou uma tendência a uma melhoria mais rápida e melhor resultado neurológico (Knoller et al, 2002).

No entanto, um estudo de fase III, conduzido em 15 países em 86 centros especializado e envolvendo 861 pacientes falhou em demonstrar qualquer efeito favorável (Maas et al., 2006).

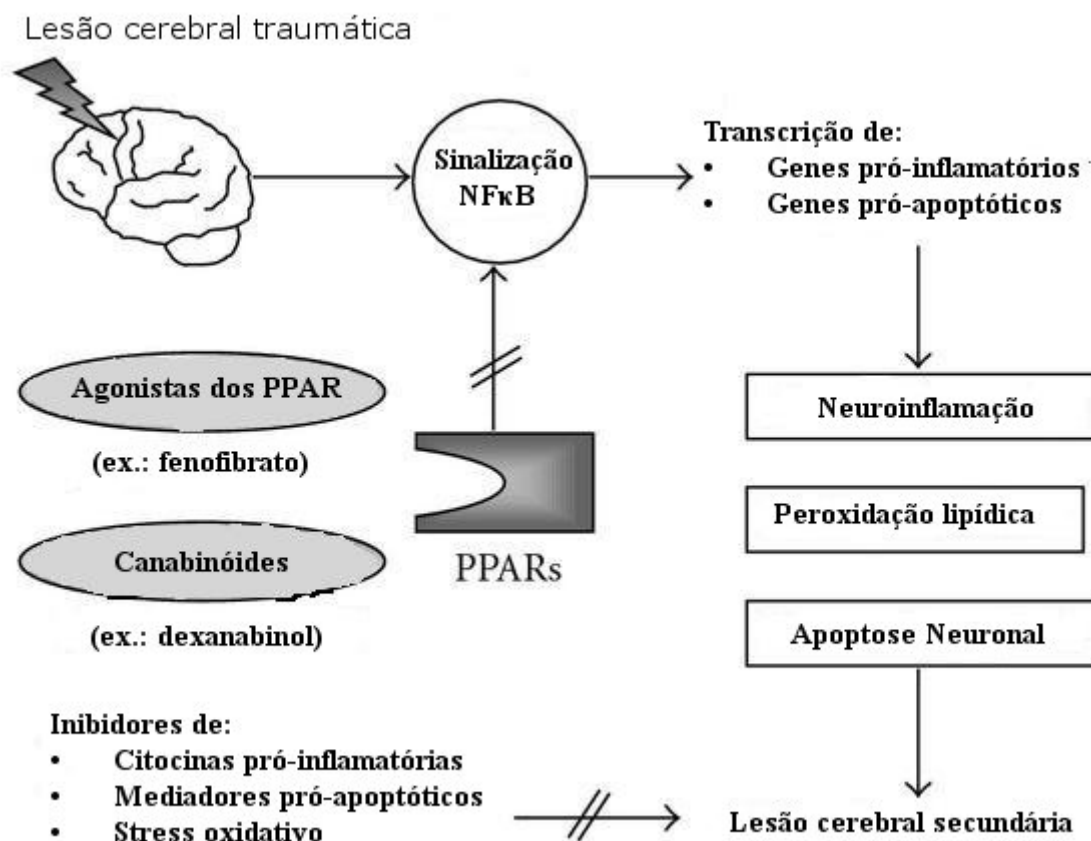


Figura 7: Hipótese dos mecanismos mediados por activação de PPAR (por canabinóides) que conferem neuroprotecção após lesão cerebral traumática (adaptado de Stahel et al, 2008)

Canabinóides na neurodegeneração crónica

Muito antes do primeiro receptor canabinóide ter sido clonado (Matsuda et al., 1990) existiam descrições de vários casos em que a cannabis era usada como terapêutica para várias doenças neurodegenerativas. Estes compostos, com base nas suas propriedades anti-glutamatérgicas, antioxidantes e/ou anti-inflamatórias, podem também ser úteis para retardar ou impedir a progressão da degeneração neuronal em doenças crónicas, onde processos como excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, falta de energia, stress oxidativo e inflamação são eventos cooperativos para a patogénese de doenças como DA, ELA, DH, DP, EM e outras patologias. Isto adiciona-se a outros benefícios descritos para os compostos baseados em canabinóides no alívio de sinais clínicos específicos, como o efeito anti-hipercinético na DH ou os efeitos antiespásticos na EM produzidos por agonistas directos ou indirectos dos receptores canabinóides. Em contraste, o bloqueio dos receptores CB1 tem sido descrito como sendo efectivo na melhoria da inibição motora na DH e os défices de memória na DA. Os efeitos no alívio de sintomas serão aqui descritos apenas brevemente.

Doença de Huntington

A doença de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa hereditária (autossómica dominante) caracterizada por anormalidades motoras, disfunção cognitiva e sintomas psiquiátricos, que se apresenta na idade média da vida e é, em última instância, fatal. A mudança neuropatológica mais acentuada nestes pacientes é a degeneração preferencial e progressiva do estriado, devido à morte selectiva dos neurónios de projecção estriados (esses neurónios contêm receptores CB1), a qual é

acompanhada por um padrão bifásico de deterioração motora que evolui de uma primeira fase hipercinética (movimentos coreiformes) para uma fase tardia acinética, e mais debilitante. Embora tenha sido demonstrado que a DH é de origem genética (é causada por uma mutação num gene localizado no cromossoma 4 (4p16.3), originando uma expansão de uma região poliglutamínica na porção N-terminal da proteína huntingtina), os mecanismos subjacentes à degeneração do estriado são ainda desconhecidos. Além disso, o desenrolar terapêutico para os pacientes com DH tem sido escasso, tendo os tratamentos demonstrado ser fracos em termos de melhoria de qualidade de vida para estes doentes. Neste contexto, os agonistas dos canabinóides podem providenciar benefícios terapêuticos em ambos os aspectos, uma vez que eles produzem hipocinésia e também neuroprotecção.

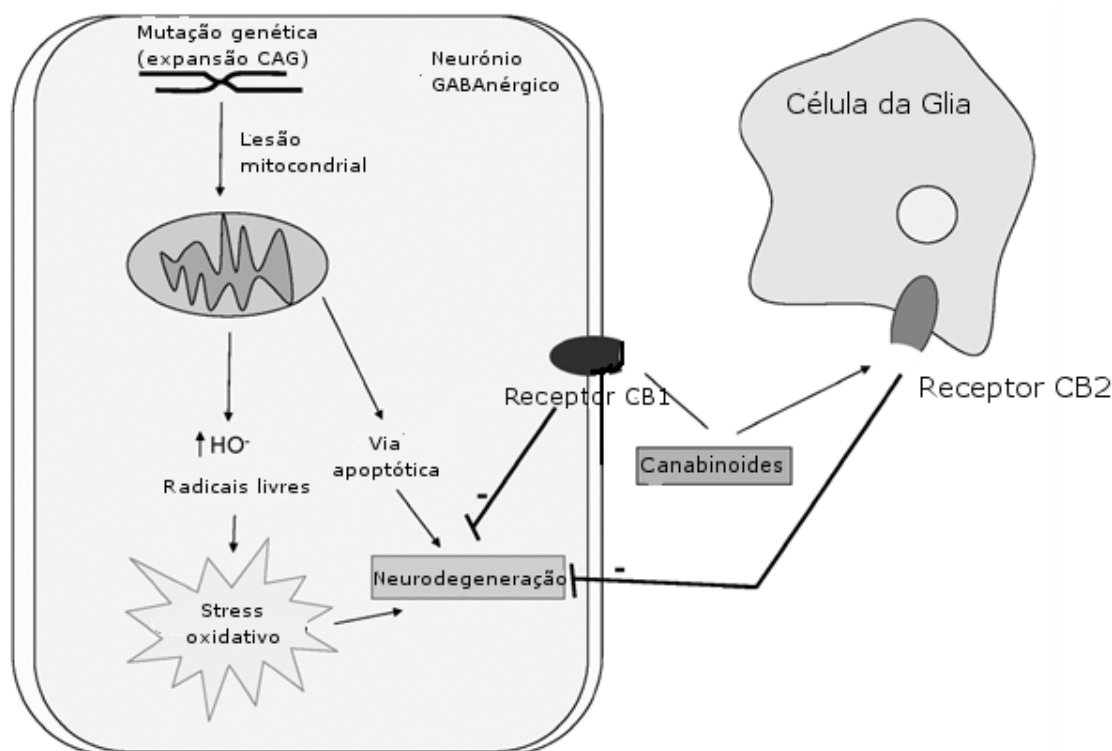


Figura 8: Esquema dos mecanismos específicos pelos quais os canabinóides promovem neuroprotec o na Doença de Huntington. (adaptado de de Lago et al., 2007)

Como mencionado anteriormente, estudos recentes têm referido os efeitos anti-hipercinéticos de agonistas canabinóides directos ou indirectos em modelos animais de DH e em humanos, baseados na demonstração de que a transmissão de endocanabinóides se torna hipofuncionante nos glânglios basais nesta afecção (Lastres-Becker et al., 2002; Lastres-Becker et al., 2003). Posteriormente, o potencial neuroprotector dos canabinóides foi também avaliado nesta doença e, embora a matéria ainda esteja longe de ser clara, alguns resultados providenciaram expectativas promissoras (Lastres-Becker et al., 2003; Lastres-Becker et al., 2004). Lastres-Becker et al. (2005) verificaram que ratos com atrofia do estriado, causada pela injeção de toxinas mitocondriais, exibiam profundas mudanças na activação da proteína G por agonistas dos receptores CB1, vários dias antes da degeneração marcada do estriado e aparecimento de sintomas motores severos, e na ausência de modificações significativas dos locais de ligação e níveis de mRNA para este receptor (Lastres-Becker et al., 2004). Todas estas observações, colectivamente, suportam a noção que mudanças funcionais precoces nos receptores CB1 podem estar envolvidas na patogénese da DH mas, mais importante, podem desempenhar um papel essencial na neurodegeneração do estriado. Por outras palavras, esses defeitos na sinalização do receptor CB1 podem tornar os neurónios mais vulneráveis ao processo degenerativo associado com a DH e a estimulação desses receptores pode reduzir/atrasar a progressão da degeneração do estriado.

Esta hipótese foi igualmente considerada por van de Stelt et al. (2002), os quais, considerando os dados obtidos na DH e também em outras patologias, propuseram que o mau funcionamento do sistema endocanabinóide (ex. se a síntese de AEA ou 2-AG for inibida, os receptores CB1 forem inactivos ou a sua expressão for perdida) pode ser um

sinal para desencadear um desequilíbrio na homeostase do glutamato e iniciar excitotoxicidade.

O potencial neuroprotector dos canabinóides, na DH, seria baseado em um ou mais dos mecanismos descritos pelos quais os canabinóides podem reduzir o dano neuronal (actuando como antioxidantes químicos, inibindo a libertação de glutamato, reduzindo o influxo de Ca^{2+} e/ou produzindo efeitos anti-inflamatórios

O Δ^9 -THC protegeu os neurónios do estriado contra a toxicidade *in vivo* do ácido 3-nitropropiónico, uma toxina mitocondrial que replica a deficiência do complexo II, característica dos doentes com DH (Lastres – Becker et al., 2004). No entanto, continua por demonstrar se o efeito neuroprotector do Δ^9 -THC neste modelo animal de DH é provocado pela activação de receptores CB1, CB2 ou ambos, e ainda por outros mecanismos produzidos por Δ^9 -THC.

Doença de Parkinson

A principal neuropatologia clínica na Doença de Parkinson (DP) inclui bradicinésia (lentidão de movimentos), rigidez e tremor causados pela degeneração progressiva dos neurónios dopaminérgicos da substância nigra pars compacta o que leva a uma desnervação dopaminérgica severa do estriado. Embora a etiologia da DP seja actualmente desconhecida, os processos patogénicos principais que despoletam a perda progressiva dos neurónios dopaminérgicos da substância nigra são o stress oxidativo, a disfunção mitocondrial e estímulos inflamatórios. A terapia de substituição dopaminérgica com L-dopa melhora a rigidez e a bradicinésia em doentes com DP, pelo menos nas fases precoces e intermédias desta doença. Mais tarde, o uso crónico desta terapia perde eficiência e desencadeia o aparecimento de um estado irreversível de

discinésia, caracterizado por movimentos involuntários. Uma vez que os agonistas dos canabinóides partilham algumas das propriedades já mencionadas, têm sido propostos como potenciais substâncias neuroprotectoras também na DP, embora o assunto tenha sido explorado apenas recentemente. No entanto, o seu perfil hipocinético é uma desvantagem neste caso, porque, apesar da sua actividade neuroprotectora em tratamentos de longa duração, eles potenciam, ao invés de reduzir os sintomas motores nesta doença, como foi revelado por alguns estudos clínicos (Fernández-Ruiz et al., 2002). Este facto é compatível com a observação da superactividade da transmissão de endocanabinóides nos gânglios da base na DP, tanto em doentes, como em modelos animais (Lastres-Becker et al., 2001). Desta forma, é explicado o perfil hipocinético desta doença e a recente proposta do uso de antagonistas do receptor CB1 para aliviar a bradicinésia e a rigidez, em particular em fases tardias da DP, quando a terapia com L-dopa é menos efectiva (Brotchie, 2003). Haverá apenas uma excepção para os agonistas canabinóides serem usados para alívio de sintomas na DP: os pacientes para quem o tremor é o sintoma major. Os agonistas CB1 podem ser úteis para aliviar este sintoma, devido ao bem conhecido efeito inibitório dos agonistas canabinóides na libertação de glutamato por neurónios subtalamonígricos (Sañudo-Peña et al., 1998), cuja hiperactividade é responsável pelo tremor.

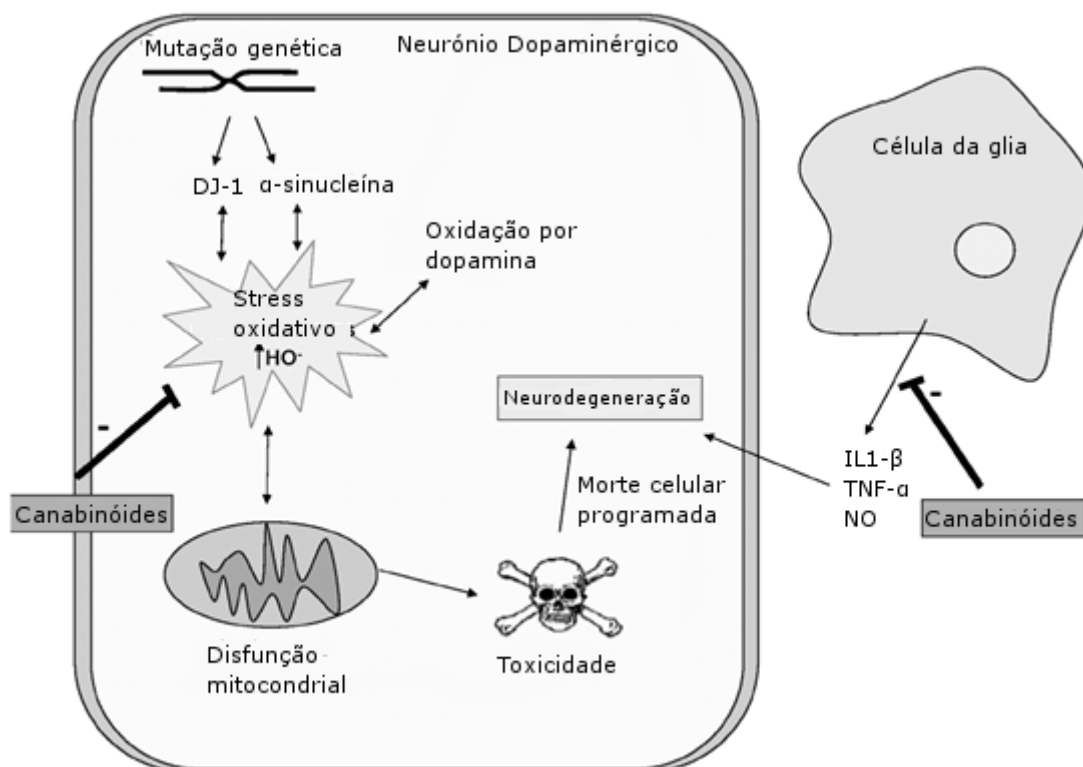


Figura 9: Esquema da protecção induzida por canabinóides nas Doença de Parkinson (adaptado de de Lago et al., 2007)

Relativamente à neuroprotecção induzida por canabinóides na DP, estudos pré-clínicos realizados com Δ^9 -THC revelaram que este composto pode também ter acção neuroprotectora nesta afecção (Lastres-Becker et al., 2005). A administração de Δ^9 -THC reverteu a incapacidade de transmissão dopaminérgica nos gânglios basais de ratos com hemiparkinsonismo causado pela aplicação unilateral de 6-hidroxidopamina. Esses efeitos não ocorreram nas estruturas contralaterais, indicando que os efeitos do Δ^9 -THC foram produzidos pela redução da morte celular dopaminérgica no lado lesionado, ao invés da produção de efeitos reguladores nos neurónios sobreviventes. A quantificação dos níveis de mRNA da tirosina-hidroxilase na substância nigra desses animais corrobora este achado. No entanto, o facto de que os mesmos efeitos neuroprotectores

foram desencadeados por CBD, sugere que esses efeitos neuroprotectores poderiam ser independentes do receptor CB1, com base nas propriedades antioxidantes de ambos os canabinóides derivados de plantas. Esta observação é similar aos resultados obtidos por Hampson et al. (1998), que compararam os efeitos neuroprotectores do Δ^9 -THC e do CBD em culturas de neurónios corticais de rato, expostos a níveis tóxicos de glutamato.

No entanto, Lastres-Becker et al. (2005) encontraram evidências de que os efeitos mediados pela glia estão também envolvidos na neuroprotecção providenciada por canabinóides na DP. Neste sentido, embora a causa da morte de células dopaminérgicas ainda seja desconhecida, foi postulado que alterações na função das células da glia (ex. activação da microglia) pode também desempenhar um papel importante na iniciação e/ou progressão precoce do processo neurodegenerativo, em especial numa região como a substância nigra que é particularmente rica em microglia e outras células da glia. Baseado no presuposto de que vários factores citotóxicos derivados da glia como os TNF- α , IL-1 β , NO e outros, estariam elevados na substância nigra e caudato putamen destes doentes, Lastres-Becker et al. (2005) efectuaram um estudo *in vitro* para avaliar o efeito dos agonistas canabinóides na toxicidade neuronal da 6-hidroxidopamina. Encontraram um aumento marcado na sobrevivência neuronal quando as células foram incubadas com um meio condicionante, gerado por exposição das células da glia ao canabinóide não selectivo HU-210, quando comparado com o fraco aumento na sobrevivência neuronal produzida por exposição directa das células neuronais ao HU-210. Isto suporta a hipótese de que a neuroprotecção por canabinóides na DP pode ser significativamente dependente, não apenas do potencial antioxidante de certos canabinóides, mas também nos efeitos anti-inflamatórios mediados por células da glia, descritos para a maioria destes compostos (Walter et al., 2004). Com base no papel dos canabinóides atribuído aos receptores CB2 sobre os efeitos mediados pela glia, é

possível que este subtipo de receptor possa estar envolvido, pelo menos em parte dos efeitos observados na DP, embora esta questão deva ser explorada em estudos futuros.

Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de doença nos idosos, afectando em Portugal, em 1991, cerca de 50000 doentes, e estimando-se que em 2010 existam cerca de 76000 pessoas afectadas por esta patologia (Ferreira et al., 1999). As características patológicas da doença são actualmente bem conhecidas e incluem placas neuríticas (enriquecidas em péptido β -amiloide, A β) e em tranças fibrilares enriquecidas em proteínas tau hiperfosforiladas, perda neuronal, disfunção sináptica e glicose. Admite-se, actualmente, que o processamento aberrante da proteína precursora da β -amiloide conduz à formação de depósitos de A β os quais, em conjugação com outros factores, induz stress em neurónios vizinhos, resultando na hiperfosforilação da tau e levando à formação de tranças neurofibrilares. Ainda mais, este processo inicia uma resposta inflamatória na qual astrócitos e microglia desempenham um papel crítico, como o descrito para outras doenças neurodegenerativas. A terapêutica actual para a DA é apenas sintomática, no domínio da cognição, e inclui dois grupos de fármaco: os inibidores das acetilcolinesterases e os bloqueadores dos receptores do N-metil-D-aspartato, NMDA.

A terapêutica sintomática não exerce efeito significativo na progressão da doença e as tentativas para modificar esta progressão devem ter em consideração a patogénese, em particular a cascata amilóide e, em adição a proteína tau.

Os canabinóides foram propostos como candidatos, tanto para o alívio de sintomas, como para o abrandar da degeneração (Pazos et al., 2004).

As evidências que relacionam canabinóides com a DA são relativamente recentes e foram obtidas quer em estudos bioquímicos quer farmacológicos. Westlake et al. descreveram, em 1994, uma diminuição da expressão do gene do receptor CB1 em tecidos *post mortem* na DA, em particular nos gânglios da base, mas que não podem ser atribuídos ao processo patológico. Mais recentemente, Benito et al. (2003) descreveram que os níveis de receptor CB1 se mantiveram inalterados em regiões cerebrais afectadas por depósitos de A β . Neste estudo imunohistoquímico foi observada uma ligeira diminuição da intensidade da coloração das amostras, mas a distribuição de proteínas receptoras CB1 foi basicamente a mesma que nos casos controlo.

Em contraste com a ausência de mudanças nos receptores CB1, a análise em tecidos *post mortem* de doentes com DA revelou que os receptores CB2 são selectivamente super-expressos nas células da microglia que estão associadas com placas neuríticas enriquecidas de A β . Esta selectividade é especialmente marcada, uma vez que microglia parenquimatosa (silenciosa) não parece expressar receptores CB2. Dados recentes indiciam que os receptores CB2 podem também ser expressados por uma população limitada de células da microglia em cérebro saudável, ex. células da microglia perivasculares, as quais desempenham um papel central nos processos infecciosos que afectam o SNC (Núñez et al., 2004). Pode ser posta a hipótese de que a indução dos receptores CB2, nas células da microglia que rodeiam as placas neuríticas na DA, podem ser parte de uma resposta anti-inflamatória do SNC de forma a proteger os neurónios da degeneração. Além disso, a expressão de FAAH e a actividade enzimática estão aumentadas nas placas neuríticas de amostras tecidulares de DA em particular, a FAAH parece ser abundantemente expressa pela astroglia associada à placa (Benito et al., 2003; Pazos et al, 2004). Estes resultados sugerem que a FAAH pode

participar no papel importante que os astrócitos desempenham na resposta da glia ao depósito de A β .

Apesar da observação de alterações nos elementos específicos do sistema endocanabinóide, em particular nos receptores CB2, durante a patogénese da DA, dispomos ainda de poucos dados préclínicos ou clínicos referentes à utilização terapêutica potencial dos canabinóides nesta doença. Outros dados recentes sobre as propriedades neuroprotectoras putativas e anti-inflamatórias dos canabinóides abriram novas perspectivas que podem ser de interesse na DA. Milton (2002) estudou a contribuição dos receptores CB1 num modelo *in vitro* de DA, numa linha celular, tendo mostrado que a AEA é capaz de prevenir a neurotoxicidade induzida por A β através de um mecanismo mediado por receptor CB1. Após exposição a diferentes péptidos fibrinogénicos, este endocanabinóide em concentrações nanomolares, demonstrou prevenir os efeitos tóxicos no modelo *in vitro* que utilizaram. O efeito protector foi revertido por um antagonista do receptor CB1 específico, o AM251, e seria mediado pela via da proteína cinase mitogénica activada, uma vez que um inibidor selectivo desta via de sinalização também preveniu os efeitos protector da AEA. Resultados similares foram publicados por Iuvone et al. (2004) usando células PC12 em cultura. Esses autores encontraram uma marcada redução na sobrevivência celular após exposição de células a A β , que foi associada a um aumento na produção de espécies reactivas de oxigénio e peroxidação lipídica, assim como activação da caspase 3, fragmentação do ADN e aumento do cálcio intracelular. É interessante acentuar que o tratamento das células com CBD previamente à exposição a A β , aumenta significativamente a sobrevivência celular enquanto diminui o stress oxidativo, peroxidação lipídica, níveis de caspase 3, fragmentação de ADN e cálcio intracelular. Os mesmos autores concluíram que o CBD exerce uma combinação de efeitos neuroprotectores,

antioxidantes e antiapoptóticos contra a toxicidade por A β , e que a inibição do aparecimento da caspase 3 a partir do seu precursor inactivo, a pró-caspase 3, pelo CBD, pode estar envolvida na via de sinalização para a neuroprotecção.

Já Ramirez et al., em 2005, descreveram que a administração intraventricular a ratos do canabinóide sintético WIN55,212-2 previne a activação da microglia induzida por β - Amilóide, o declínio cognitivo e a perda de marcadores neuronais, e que o HU-210, o WIN55,212-2 e o JWH-133 impediram a activação mediada por β A das células da microglia em cultura.

Analizados conjuntamente, os dados obtidos pelos estudos supracitados sugerem que os canabinóides podem ter um papel importante na prevenção da neurotoxicidade induzida por A β e contrariar alguns dos seus efeitos nefastos. Sem excluir um papel para os receptores CB1 ou para outros mecanismos disponíveis por alguns canabinóides, esses dados sugerem que parte dos efeitos benéficos dos canabinóides podem ser mediados por receptores CB2, localizados nas células da glia e activados por processos inflamatórios, iniciados pela maturação das placas senis. Esses factos são similares aos descritos anteriormente relativos ao papel anti-inflamatório dos canabinóides exercido através da modulação de vários mediadores citotóxicos tais como NO, TNF- α , citocinas e outros.

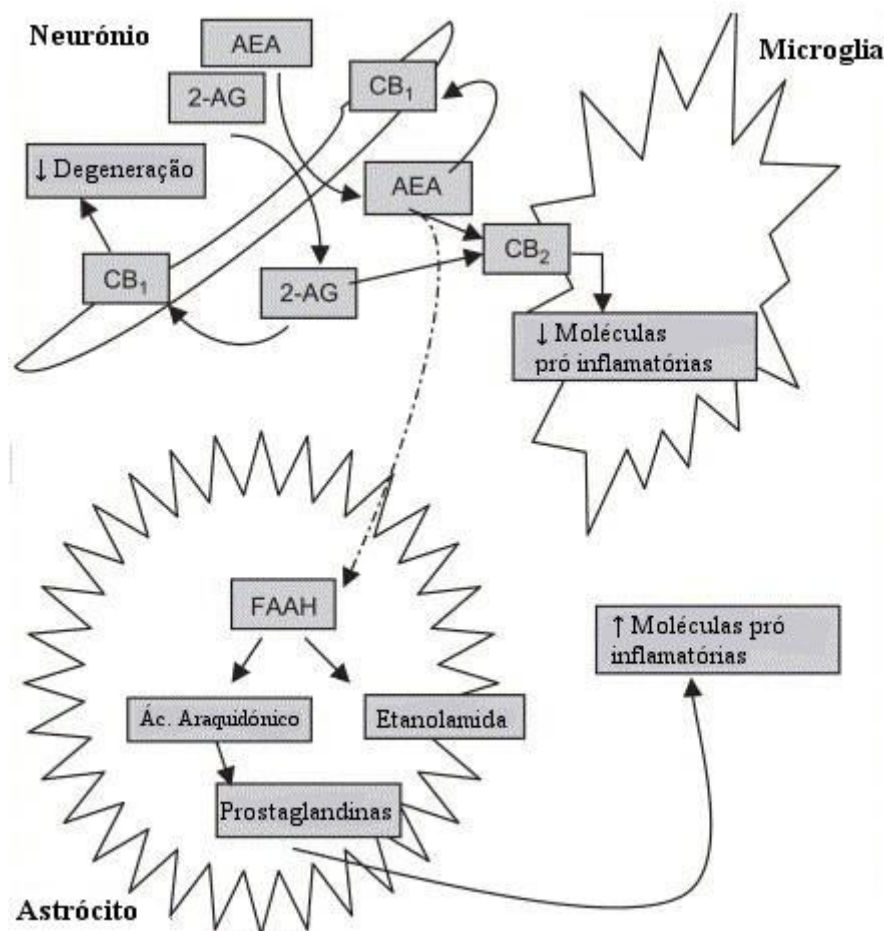


Figura 10: Modelo proposto da actuação de alguns elementos do sistema endocanabinóide na Doença de Alzheimer. (adaptado de Pazos et al., 2004).

Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurológica que representa a causa mais frequente de incapacidade não traumática, crónica, em adultos jovens. É uma doença autoimune que causa desmielinização e perda axonal, em particular da espinal medula, resultando numa variedade de sinais neurológicos, dos quais a dor e o descontrolo motor são os mais característicos. A natureza dos seus sintomas resulta de onde ocorreu

a desmielinização e a perda de axónios. Foi inicialmente admitido que os sinais neurológicos na EM eram, em exclusivo causados por processos inflamatórios originados pela entrada de células imunes activadas no SNC, o que explica porque as terapias actuais, dirigidas a atrasar a progressão da doença, incluem agentes imunomoduladores, como substâncias dirigidas contra elementos imunes (interferão, glatirâmero ou mitoxantrona). Evidências recentes apoiam também a ocorrência última de excitotoxicidade e neurodegeneração (morte de oligodendrócitos e perda axonal) nesta doença (Werner et al., 2001), razão pela qual os canabinóides, para além dos seus efeitos benéficos em sintomas específicos da EM, podem também ser usados como moléculas neuroprotectoras para atrasar ou impedir a progressão da doença, ao protegerem os oligodendrócitos da morte e ao reduzirem a degeneração axonal (Pertwee, 2002).

Alguns doentes tornam-se muito incapacitados num curto período de tempo, enquanto outros podem viver toda a sua vida com disfunção mínima ou até mesmo sem nenhuma. As manifestações da EM são muito variáveis mas normalmente incluem a perda visual, visão dupla, fraqueza motora, espasticidade, ataxia, tremor, perda sensitiva, perda da função dos esfíncteres e incapacidade cognitiva. No que se refere aos efeitos redutores destes sintomas por canabinóides, a maioria dos estudos foram focalizados no controlo da dor e dos sintomas motores, como a espasticidade, tremor e distonia. Tentaram providenciar um suporte experimental sólido para os dados não controlados e pré-clínicos prévios que sugeriam um efeito benéfico da marijuana, quando fumada pelos pacientes com EM, para aliviar sintomas específicos como a espasticidade, distonia, tremor, ataxia, dor e outros (Pertwee, 2002). Neste sentido Zajicek et al., publicaram em 2005, o primeiro estudo em grande escala sobre a hipótese dos canabinóides terem efeitos benéficos nos sintomas da EM.

Em estudos animais, experiências de Baker et al. (2001), revelaram um efeito anti-espástico potente de agonistas canabinóides derivados de plantas e endógenos, num modelo de rato de EM e de encefalomielite autoimune experimental recorrente crónica (CREAE). Também ficou provado que esses efeitos foram mediados pelo receptor CB1 e, em menor extensão, pelo receptor CB2, sendo contrariados pela administração dos antagonistas canabinóides SR141716 e SR144528.. Usando o mesmo modelo de rato, eles também descreveram efeitos anti-espásticos de compostos que são capazes de inibir o processo de terminação da actividade biológica de endocanabinóides. Estes resultados estão de acordo com o aumento nos níveis de endocanabinóides encontrados no cérebro e, em particular, na espinhal medula desses animais. A administração crónica de canabinóides derivados de plantas ou de inibidores específicos da captação de endocanabinóides pode também reduzir ou atrasar a incidência e severidade dos sinais clínicos em ratos com encefalomielite experimental autoimune (EAE), um modelo monofásico de EM onde apenas tem lugar a inflamação (Wirguin et al., 1994; Cabranes et al., 2005). No entanto, a melhoria da EM experimental neste modelo de rato é, provavelmente, devida ao facto de os agonistas canabinóides actuarem quer como agentes imunossuppressores, ao prevenirem a acumulação de células inflamatórias no SNC (Wirguin et al., 1994), ou por exercerem um efeito anti-inflamatório directo. Efeitos benéficos dos canabinóides foram também descritos por Arévalo-Martin et al. (2003) num modelo de EM criado pela infecção com o vírus murino da encefalomielite de Theiler. Nesses animais, os agonistas canabinóides induziram a melhoria da função motora, reduziram a micróglia activada e promoveram a remielinização na espinhal medula, levando a acreditar que os canabinóides podem providenciar efeitos benéficos na EM, que serão superiores ao alívio sintomático.

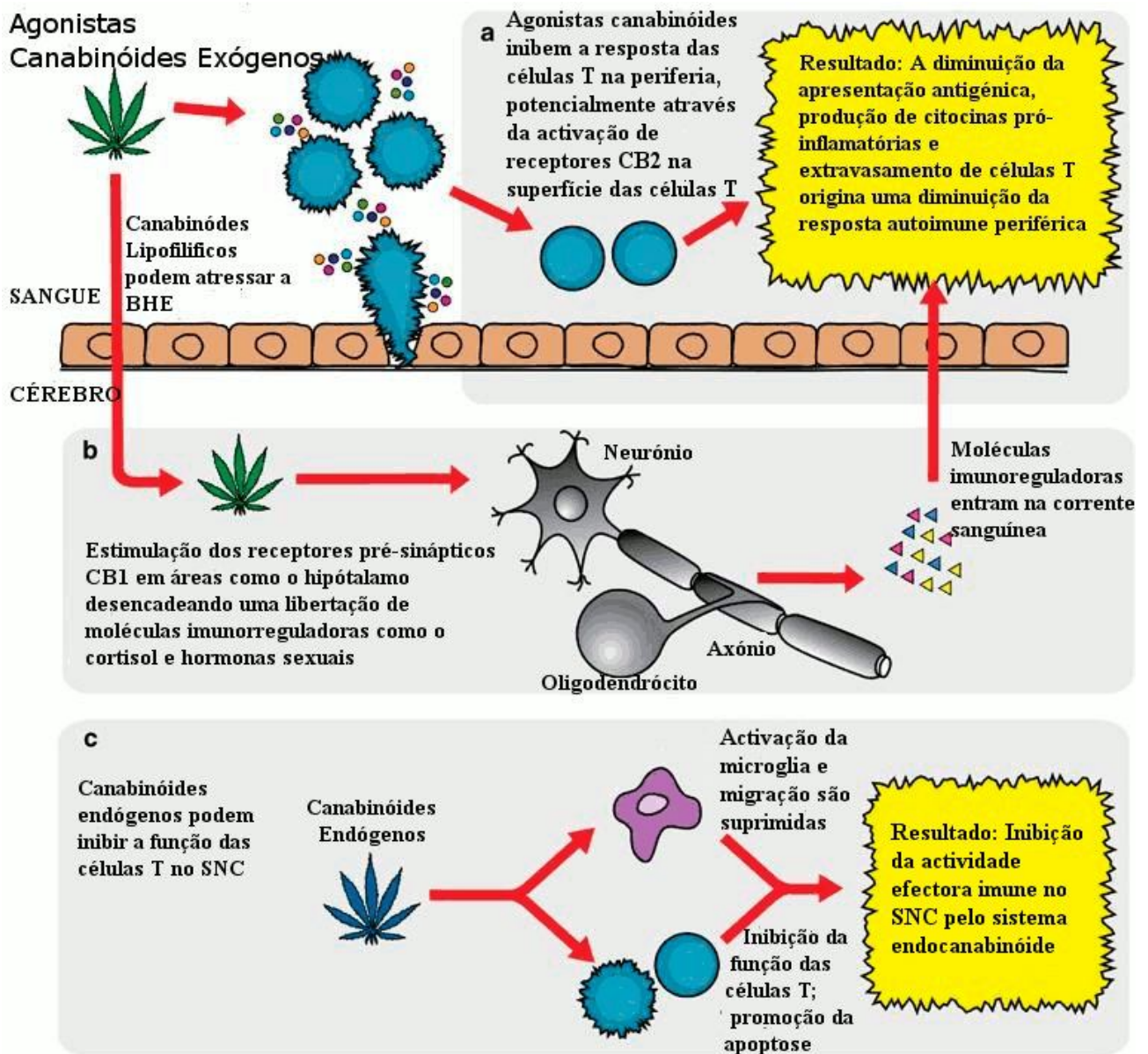


Figura 11: Imunorregulação por canabinóides exógenos (a e b) e endógenos (c)

(adaptado de Baker et al., 2007)

Apesar do progresso na avaliação farmacológica da medicina baseada em canabinóides na EM em modelos animais e pacientes, não dispomos de dados sobre

possíveis alterações nos receptores CB1 e CB2 em cérebros *post mortem* de pacientes com EM, e apenas uns poucos estudos examinaram a transmissão endocanabinóide em modelos animais desta doença (Baker et al., 2001; Berrendero et al., 2001; Cabranes et al., 2005). Assim, Baker et al. (2001) referiram um aumento dos níveis de endocanabinóides no cérebro e, em particular, na espinhal medula no modelo de rato de EM, que foi interpretado pelos mesmos autores como indicativo de uma influência endocanabinóide no controlo de alguns sintomas da EM, num ambiente de dano neurológico existente. Berrendero et al. (2001) descrevem que, usando ratos EAE, se registou uma diminuição da ligação ao receptor CB1 e de níveis de mRNA, embora a diminuição de receptores CB1 fosse maioritariamente circunscrita aos gânglios da base (putamen caudado lateral e mediano) e numa menor extensão às regiões corticais. Cabranes et al. (2005) também depararam com uma redução dos níveis de endocanabinóides nessas e em outras estruturas cerebrais. No entanto, como a patologia nos modelos de EM ocorre principalmente na espinhal medula, a relevância das observações nos gânglios da base permanece para ser elucidada, embora seja possível que sejam um evento secundário adaptativo originado por mudanças primárias ao nível espinhal. Desta forma poderiam estar relacionados com a deterioração motora, que é um dos sinais neurológicos mais proeminente nestes ratos e também na doença humana (Berrendero et al., 2001; Pertwee, 2002; Baker et al., 2007; Cabranes et al., 2005). Baseado neste facto, Cabranes et al. (2005) levantam a hipótese de que as mudanças nos receptores CB1 e seus ligandos nos gânglios da base, possam estar associados com distúrbios em vários neurotransmissores que actuem neste circuito. Se este for o caso, os bem conhecidos efeitos dos agonistas canabinóides nesses neurotransmissores podem estar subjacentes aos efeitos benéficos destes compostos nos sintomas motores da EM. No entanto, esta hipótese provou estar errada, uma vez que não foram encontradas

nenhumas mudanças na dopamina, serotonina, GABA ou glutamato nos gânglios da base de modelos de rato com EM (Cabranes et al., 2005).

Esclerose Lateral Aminotrófica

A Esclerose lateral aminotrófica (ELA), também conhecida como a doença de Lou Gehrig, é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns, ocorrendo tanto esporadicamente como de modo familiar, com demonstração de hereditariedade em cerca de 10% dos pacientes. Embora mostre múltiplas variantes clínicas, é caracterizada primariamente pela degeneração de neurónios motores e, depois neurónios corticais. Embora os mecanismos patológicos subjacentes à ELA ainda não estejam totalmente elucidados, existem fortes evidências de que vários mecanismos neurotóxicos incluindo excitotoxicidade, inflamação e stress oxidativo possam contribuir para a sua patógenese.

Noções recentes suportam a possibilidade de que os canabinóides possam funcionar como agentes neuroprotectores na doença. Estas evidências foram obtidas por Raman et al. (2004) num modelo de rato genético de ELA (rato transgénico SOD1^{G93A}) que supra-expressa uma forma mutante da enzima superóxido dismutase 1 cobre/zinco (SOD-1), que está relacionada com aproximadamente 20% dos casos familiares de ELA. Esta enzima desempenha um papel crítico como resgatador endógeno do anião superóxido, reduzindo desta forma a ocorrência de stress oxidativo. A mutação da SOD-1 aumenta a formação de aniões superóxido e o dano tecidual oxidativo, constituindo o processo chave que desencadeia todas as características sintomatológicas deste modelo de rato genético de ELA. Raman et al. (2004) referiram que o Δ^9 -THC foi eficaz a atrasar a incapacidade motora e a prolongar a sobrevivência se administrado antes, ou logo depois do início dos sinais no modelo de rato de ELA. Além disso, o Δ^9 -THC foi

também eficaz na redução do dano oxidativo e da excitotoxicidade em culturas de espinhal medula. Também Witting et al. (2005) e Bilslund et al. (2006) descreveram um aumento de endocanabinóides (2-AG e AEA) no mesmo modelo de ratos transgénico SOD1^{G93A}, assim como uma diminuição da progressão da doença em ratos pós-sintomáticos tratados com WIN55,212-2 (Bilslund et al., 2006) e com CBD (Weydt et al., 2005). Até há data não existem dados de uma possível alteração de elementos específicos do sistema endocanabinóide em humanos afectados por esta doença.

Epilepsia

A Epilepsia afecta cerca de 1% da população mundial. É estimado que 20-30% dos epiléticos não estejam controlados adequadamente com os fármacos convencionais.

Se o equilíbrio entre as comunicações excitatórias e inibitórias entre neurónios for quebrado, a intensidade da transmissão excitatória pode exceder um certo limiar, provocando convulsões epiléticas. A estimulação dos neurónios pós-sináptico, é conhecida por activar a síntese de endocanabinóides através do aumento do Ca²⁺ intracelular e/ou estimulação de receptores metabotrópicos. Desta forma, os endocanabinóides são libertados e alcançam os receptores pré-sinápticos CB1 de forma retrógrada para modular, através de múltiplos mecanismos, tanto a transmissão inibitória GABAérgica como a excitatória glutamatérgica.

O Canabidiol parece ser o canabinóide mais promissor nos estudos animais. Várias descrições esporádicas sugerem que a cannabis tem propriedades anticonvulsivas e é efectiva no tratamento de epilepsias parciais e convulsões tónico-clónicas generalizadas. São baseadas, entre outros, no facto de, em indivíduos que fumem

marijuana para tratar a sua epilepsia, a suspensão do consumo de cannabis precipitar a reaparição de convulsões, enquanto o retorno ao uso desta droga psicotrópica controlara de novo a epilepsia; estes resultados foram reprodutíveis (Gurley et al., 1998). Existem apenas estudos clínicos controlados em pequena escala, que demonstraram esta aplicação terapêutica.

Em resumo, o uso de canabinóides para o tratamento da epilepsia é ainda controverso, embora estudos experimentais recentes tenham providenciado nova informação. O uso potencial do canabidiol e de inibidores do transporte e degradação da anandamida necessitam de mais investigação.

Encefalite induzida por VIH

A disfunção e degeneração neuronais são responsáveis pela demência e deterioração cognitiva presentes na Sida. Apesar de causar patologia neuronal, o VIH não infecta os neurónios directamente, sendo a disfunção ou morte neuronal consequências indirectas do comprometimento da função das células da glia e das toxinas celulares e virais libertadas por estas células quando infectadas.

Como já foi mencionado, a presença de receptores CB2 no cérebro humano saudável é limitada, centrando-se numa discreta população de células perivasculares, identificadas como macrófagos perivasculares (Núñez et al., 2004). Embora sejam consideradas como parte da barreira hematoencefálica, a sua localização selectiva, em contacto com a parede externa dos vasos sanguíneos confere-lhes um papel privilegiado na participação do controlo da entrada de elementos exógenos no SNC. Além disso, são consideradas células residentes temporárias no SNC, uma vez que são continuamente

substituídas pelos monócitos. A encefalite induzida pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 é a base do paradigma clínico da demência da imunodeficiência adquirida. Estes pacientes exibem uma miríade de sintomas cognitivos e motores, incluindo fraqueza nas pernas, falta de memória, apatia, isolamento social e mudanças de personalidade. Na sua forma mais avançada e severa, a doença conduz o paciente progressivamente a um estado vegetativo (González-Scarano e Martín-García, 2005).

Actualmente admite-se que a entrada do VIH-1 no SNC segue uma estratégia tipo “cavalo de Troia” (Kaul et al., 2001), onde os monócitos periféricos infectados, comprometidos a substituir os macrófagos perivasculares actuam como transportadores do vírus. Desta forma, os monócitos que se diferenciaram em macrófagos perivasculares são a origem de todo o vírus encontrado no cérebro (González-Scarano e Martín-García, 2005). Uma vez no interior do SNC, os macrófagos infectados constituem a fonte do vírus que actua na microglia, sendo os neurónios poupados. No final, vários mecanismos (incluindo o stress oxidativo, produção e libertação de citocinas pró-inflamatórias, e danos directos provocados por proteínas virais) levam à neurodegeneração e sintomas clínicos subsequentes (González-Scarano e Martín-García, 2005).

De modo idêntico ao que acontece com outros tipos de receptores acoplados a proteínas G, o CB2 é sobre-regulado nos macrófagos perivasculares como consequência do processo inflamatório desencadeado pelo VIH-1. Benito et al., (2005), usando amostras de cérebros humanos e de macaco infectados, observaram que apenas as amostras de indivíduos infectados com encefalite mostravam níveis elevados de expressão de CB2, em contraste com aqueles dos indivíduos controlo e infectados sem encefalite. O aumento na expressão CB2 foi especialmente evidente nos macrófagos perivasculares e tufo da microglia (Benito et al., 2005). É interessante realçar que os

linfócitos T infiltrados também mostraram uma forte imunoreactividade para os receptores CB2. Ghosh et al. (2006) mostraram que a activação de receptores CB2, inibe a migração transendotelial de células T Jurkat e de linfócitos T humanos primários, ao interferir com o sistema CXCL12/CXCR4. Pode-se concluir desta forma, que os receptores CB2 ao modificar a produção microglial de moléculas inflamatórias e por modulação da entrada de células periféricas no SNC podem participar na resposta inflamatória contra a infecção viral no cérebro .

Canabinóides na encefalopatia hepática

A encefalopatia hepática é uma desordem neuropsiquiátrica, sendo uma das principais complicações da falência hepática aguda e crónica. A sua patogénese permanece ainda mal compreendida e envolve múltiplos mecanismos, incluindo a produção alterada de neurotransmissores, disfunção dos astrócitos e anormalidades da perfusão cerebral. Estudos recentes revelam que os níveis cerebrais de receptores CB2 e dos ligandos 2-AG estão aumentados no modelo falência hepática fulminante induzida por tioacetamida (Avraham et al., 2005; Dagon et al., 2007). Ainda mais, a disfunção neuronal revelou melhorias tanto pela administração do agonista não selectivo CB1/CB2 Δ^9 -THC (Dagon et al., 2005) e pelos agonistas CB2 HU308 e 2 AG, assim como pelo antagonista rimonabant (Avraham et al., 2005). O efeito neuroprotector do Δ^9 -THC não foi associado a uma melhoria da função hepática, e não se encontrou no rato KO em receptores CB2, sugerindo que a neuroprotecção resulta de um efeito directo do Δ^9 -THC nos receptores cerebrais de tipo CB2. A melhoria da disfunção cerebral mediada por estes receptores está relacionada com a estimulação de proteínas cinases activadas por AMP localizadas no cérebro (Dagon et al., 2007), um regulador chave do balanço

energético que também controla a função cognitiva, via regulação da neurogénese e neuroapoptose. Estes resultados identificam o CB2 como um novo alvo neuroprotector da encefalopatia. No entanto, aguardam-se novos estudos para clarificar totalmente a contribuição respectiva dos receptores CB1 e CB2 neste processo, assim como na patologia subjacente (falência hepática), na qual se tem comprovado que o sistema canabinóide tem também função protectora.

Endocanabinóides e tumores no SNC

Estudos recentes comprovam que os canabinóides inibem o crescimento tumoral em modelos animais, mas o mecanismo da sua acção anti-tumoral *in vivo* permanece desconhecido. Estudos demonstram que os canabinóides inibem a angiogénese tumoral *in vivo*, através de pelo menos dois mecanismos: uma inibição directa da sobrevivência e migração vascular das células endoteliais, impedindo directamente desta forma a formação de vasos sanguíneos, e através da supressão de factores pró-angiogénicos e expressão de metaloproteinases da matrix nos tumores, impedindo o crescimento e desencadeando a apoptose das células tumorais (Guzmán, 2003; Blásquez et al, 2004;).

Este efeito antitumoral foi estudado em tumores do SNC, especificamente em gliomas (Velasco et al., 2004). Experiências conduzidas com ligandos selectivos quer para receptores CB1 quer para CB2 em células de glioma C6 de rato (Sanchez et al., 2001), em várias linhas celulares de astrocitoma humano (Carracedo et al., 2006) e em células obtidas de biópsias de astrocitoma humano (Sanchez et al., 2001) apoiam o conceito de que a estimulação de receptores CB2 está envolvida na actividade antitumoral canabinóide *in vitro* e em rato inoculado com xenografos de tumor *in vivo*.

Este e outros estudos também providenciaram evidências substanciais que implicam pelo menos dois mecanismos na actividade antitumoral: indução da apoptose de células tumorais e inibição da angiogénese tumoral.

Guzmán et al. (2003) e Carracedo et al. (2006) descreveram que a activação farmacológica de receptores CB2 em células de glioma ou astrocitoma induz apoptose *in vitro* e *in vivo*. Demonstraram igualmente que este processo se baseia, pelo menos em parte, na indução através do receptor CB2, da síntese de novo de ceramida, um segundo

mensageiro esfingolípido com funções no ciclo celular. É importante salientar que a ceramida celular tem sido inversamente relacionada com a progressão maligna e um mau prognóstico em astrocitomas humanos. Desta forma, astrocitomas de baixo grau têm um maior conteúdo em ceramida que astrocitomas de alto grau (Velasco et al., 2004).

Alguns dos efectores da cascata de apoptose mediada por ceramida têm sido recentemente caracterizados em células de glioma tratadas com canabinóide *in vivo* e *in vitro* (Carracedo et al., 2006). Por exemplo, ceramida que tenha sido sintetizada *de novo* activa várias vias celulares pró-apoptóticas, que podem convergir na mitocôndria – por um mecanismo até agora desconhecido – para despoletar a via apoptótica intrínseca e a activação das caspases executoras.

Por outro lado, para crescer para além de um tamanho mínimo, os tumores precisam de criar um novo suprimento vascular (angiogénese). Deste modo, o bloqueio do processo angiogénico constitui uma das abordagens antitumorais mais promissoras que estão actualmente disponíveis, sendo que esta pode ser alcançada pelo menos por vários mecanismos.

Blasquez et al. (2003) mostraram em modelos de glioma de rato que a administração de canabinóides transforma a hiperplasia vascular, característica de tumores em crescimento activo, num padrão de vasos sanguíneos caracterizado por capilares muito pequenos e impermeáveis, não tendo no entanto impacto no número total de microvasos (n.º de vasos sanguíneos por unidade de área). Esta mudança é devida, pelo menos em parte, à inibição da via do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da angiopoetina 2 (Angio2), através do receptor CB2 (Blázquez et al., 2004). É interessante salientar que a inibição farmacológica da síntese *de novo* de ceramida anula os efeitos antitumorais e antiangiogénicos dos canabinóides *in vivo*, e

diminui a produção de VEGF por células de glioma *in vitro* e *in vivo* (Blázquez et al., 2004), suportando a ideia de que a ceramida tem um papel central na acção antitumoral canabinóide. Outros factores, tais como a inibição da migração e sobrevivência das células endoteliais vasculares, e a subregulação da metaloproteinase – 2 da matriz podem também contribuir para a inibição da angiogénese do glioma e da capacidade de invasão mediada pelo receptor CB2 (Blázquez et al., 2003).

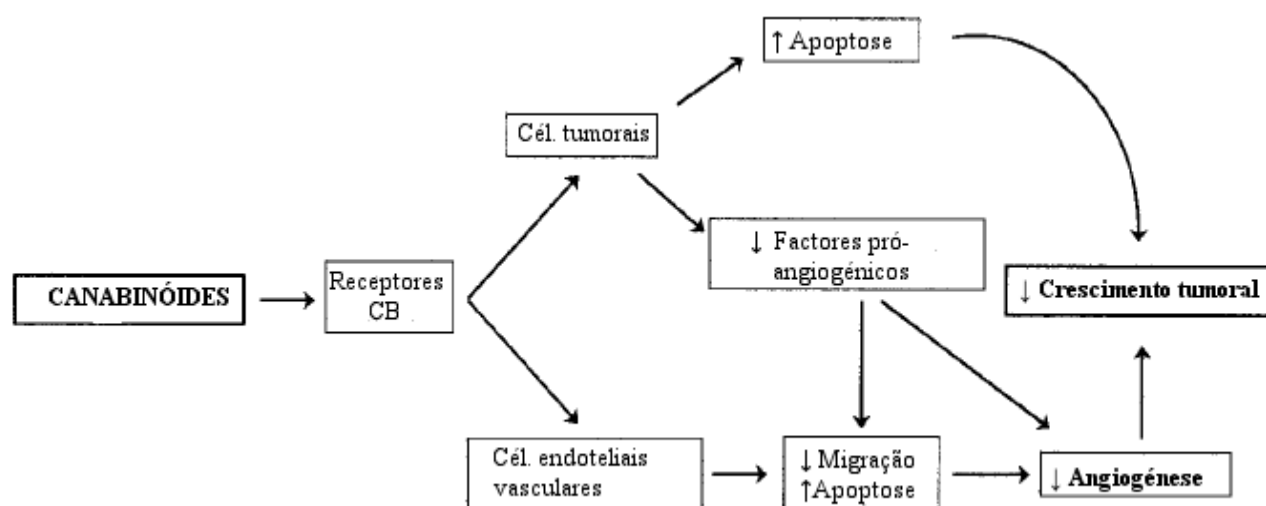


Figura 12: Acção antitumoral mediada por canabinóides (adaptado de Blázquez et al., 2003)

Actualmente um ensaio clínico de fase I no qual estão 9 pacientes com glioblastoma multiforme demonstrou um bom perfil de segurança do Δ^9 -THC juntamente com acção anti-proliferativa nas células tumorais (Guzman et al, 2006).

Outras patologias do SNC

A terapia antibiótica na meningite não oferece uma cura total para a doença, uma vez que os mediadores libertados durante a bacteriólise são igualmente nocivos e podem desencadear danos secundários. Na procura de uma terapia adjuvante (a terapia principal tem como objectivo ser bactericida) para meningite experimental no rato, Bass et al. (1996) trataram ratos infectados com *Streptococcus pneumoniae* com HU-211, para além do antibiótico ceftriaxone. Descobriram então que ratos tratados com a combinação de ceftriaxone e HU-211 desenvolviam um menor edema cerebral e disfunção da barreira hematoencefálica, quando comparados com aqueles tratados apenas com ceftriaxone. Estes resultados são encorajadores uma vez que, apesar de avanços recentes nas ciências médicas, infecções virais e bacterianas do SNC ainda resultam em alta morbilidade e mortalidade.

A exposição ao gás nervoso Soman é conhecida por causar convulsões e danos cerebrais relacionados com convulsões. A elevação dos níveis de acetilcolina é um dos eventos iniciais do Soman. Este neurotransmissor excitatório desencadeia a libertação de quantidades excessivas de glutamato, o qual, tal como descrito anteriormnte, leva ao desencadear da excitotoxicidade e morte celular. Os antagonistas NMDA, como o MK-801, reduzem a morte celular induzida por este gás, mas devido aos seu efeitos neurotóxicos não podem ser usados em humanos. Ratos a quem foi administrado HU-211, 5 a 40 min após exposição a uma dose mortífera de Soman tinham uma redução no volume de lesão cerebral superior a 80% (Filbert et al., 1999).

Neurotoxicidade induzida por canabinóides

Apesar da grande maioria dos estudos indicar as capacidades neuroprotectoras dos canabinóides, também existem aqueles que os acusam de ser neurotóxicos.

Cernak et al. (2004) põe a hipótese que a AEA possa induzir quer neuroprotecção quer neurotoxicidade, dependendo do equilíbrio das suas acções nos receptores CB1 por um lado (neuroprotecção), e por outro, nos receptores VR1 ou vias de transdução de sinal mediadas por cálcio (neurotoxicidade).

Estas observações são em parte consistentes com as de Movsesyan et al. (2004) que descrevem igualmente que a administração de anandamida, numa forma dependente da dose, provoca morte celular de neurónios corticais de rato e de células granulares cerebelosas em cultura. No entanto, os mesmos autores observaram que a inibição dos receptores canabinóides (tanto CB1 como CB2), de receptores vanilóides ou de receptores NMDA não diminuíram a perda neuronal induzida por anandamida, indicando que os efeitos tóxicos da anandamida nesta cultura neuronal primária não seriam mediados por estes receptores.

Todas estas referências não fazem mais do que dar conta do muito que ainda desconhecemos sobre canabinóides e de como é precoce a sua introdução em terapêutica, sem evidência experimental bem demonstrada.

Conclusões e perspectivas futuras

Desenvolvimentos recentes, de que são exemplo a criação de ratos “knock-out” para receptores CB1 e CB2 e a síntese de antagonistas e agonistas inversos selectivos têm permitido um melhor conhecimento do papel fisiológico e patológico do sistema endocanabinóide. No entanto, alguns aspectos fundamentais deste continuam por revelar, como por exemplo, as proteínas responsáveis pela biossíntese e transporte celular dos endocanabinóides, que ainda não foram isoladas e clonadas. A regulação das vias de biossíntese e inactivação da anandamida e 2-AG é ainda largamente desconhecida. É provável que novos subtipos de receptores canabinóides, assim como novos ligandos endógenos, sejam descobertos.

O conhecimento da complexa interrelação do sistema endocanabinóide com outros neurotransmissores no SNC (por exemplo, com o sistema vanilóide), e da sua função como mensageiros retrógrados irá melhorar bastante o nosso conhecimento do papel fisiológico deste sistema endógeno e providenciar informação útil para explorar o seu potencial para diversas intervenções nas neuropatologias.

Um outro aspecto a ter em conta é que, apesar de ensaios clínicos com ligandos dos canabinóides sejam permitidos em muitos países, o uso generalizado de marijuana com fins medicinais de alívio sintomático, como para tratar a dor e problemas na alimentação em doentes com cancro, e para reduzir a pressão intraocular em doentes com glaucoma, não está ainda legalizado. O principal argumento dado para o atraso em consentir a legalização e validação do uso da cannabis como um fármaco, baseia-se na incapacidade de controlar a concentração de compostos benéficos no fumo da cannabis, sendo impossível no momento actual dissociar as propriedades benéficas da cannabis do seu efeito psicotrópico. No entanto, deve ser referido que morfina, codeína, lidocaína e

procaína, que são todos derivados de drogas ilícitas, são comummente usados em medicina, o que nos faz antever que o aparecimento de derivados canabinóides sem efeitos psicotrópicos para uso médico generalizado não deve tardar.

Os estudos citados neste trabalho indicam que alguns agonistas dos receptores canabinóides, principalmente do receptor CB1, mas cada vez mais os do receptor CB2, podem ser úteis para melhorar o desenrolar terapêutico que segue um dano cerebral agudo e podem também atrasar a progressão gradual de doenças neurodegenerativas com uma história arrastada, com a DP, DA, EM, DH, ELA e outras.

No entanto, o envolvimento do sistema endocanabinóide na patogénese das doenças neurodegenerativas aguarda novas informações, que possam indicar quais os ligandos dos receptores canabinóides ou compostos que interfiram com a biossíntese e degradação do sistema endocanabinóide possam ser úteis no alívio de sintomas de doenças neurodegenerativas. Até à data, os poucos estudos humanos efectuados post-mortem e os pequenos ensaios clínicos dirigidos a amenizar os sintomas de diversas doenças neurodegenerativas não obtiveram sucesso. A via de administração dos canabinóides, a sua actividade psicotrópica e os possíveis efeitos pró-degenerativos (ex. indução da apoptose) são outros factores que merecem mais atenção, antes que compostos que modelem a actividade do sistema endocanabinóide sejam recursos terapêuticos úteis e utilizáveis no tratamento de doenças neurodegenerativas agudas e progressivas.

Referências

1. Alger B.E., (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*. 68: 247–286
2. Aloisi F, (1999) The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. *Adv Exp Med Biol* 468: 123–133
3. Arévalo-Martin A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C, (2003) Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 23: 2511–2516
4. Avraham Y, Israeli E, Gabbay E, Okun A, Zolotarev O, Silberman I, (2005) Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiol Dis* 12: 12.
5. Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di Marzo V, (2001) Endocannabinoids control spasticity in experimental multiple sclerosis. *FASEB J* 15: 300–302
6. Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR, (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27:1-4.

7. Baker D, Jackson SJ e Pryce G, (2007) Cannabinoid control of neuroinflammation related to multiple sclerosis, *British Journal of Pharmacology* 152, 649–654
8. Bahr M, (2004), *Neuroprotection Models, Mechanisms and Therapies*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
9. Bass R, Engelhard D, Trembovler V, Shohami E. (1996). A novel nonpsychotropic cannabinoid, HU-211, in the treatment of experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 173:735–738.
10. Benito C, Kim WK, Chavarria I, Hillard CJ, Mackie K, Tolon RM, (2005). A glial endogenous cannabinoid system is upregulated in the brains of macaques with simian immunodeficiency virusinduced encephalitis. *J Neurosci* 25: 2530–2536.
11. Benito C, Nuñez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J, (2003) Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23: 11136–11141
12. Berrendero F, Sánchez A, Cabranes A, Puerta C, Ramos JA, García-Merino A, Fernández-Ruiz J, (2001) Changes in cannabinoid CB1 receptors in

striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Synapse* 41: 195–202

13. Bilsland LG, Dick JRT, Pryce G, Petrosino S, Marzo V,†Baker D, e Greensmith L, (2006) Increasing cannabinoid levels by pharmacological and genetic manipulation delays disease progression in SOD1 mice, *The FASEB Journal*, Vol. 20, 1003-1005
14. Blázquez C, Casanova ML, Planas A, Del Pulgar TG, Villanueva C, Fernandez Acenero MJ, Aragonés J, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M, (2003) Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J* 17: 529–531
15. Blázquez, C., González-Feria L., Álvarez L, Haro A, Casanova M.L. e Guzmán M. (2004) Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res.* 64, 5617–5623
16. Brandes RP, Popp R, Ott G, Bredenkotter D, Wallner C, Busse R, Fleming I, (2002) The extracellular regulated kinases (ERK) 1/2 mediate cannabinoid-induced inhibition of gap junctional communication in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 136:709-716.
17. Brotchie JM, (2003) CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol* 3: 54–61

18. Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, Valenti M, Sánchez A, García Merino A, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz JJ, (2005) Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of certain endocannabinoid uptake inhibitors in a rat model of multiple sclerosis: involvement of vanilloid TRPV1 receptors. *Neurobiol Dis*; 20(2):207-17.
19. Carracedo, A. Lorente M, Egia A, Blázquez C, García S, Giroux V, Malicet C, Villuendas R, Gironella M, González-Feria L, Piris M. A., Iovanna J.L., Guzmán M. e Velasco G., et al. (2006) The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell* 9, 301–312
20. Cernak I., Vink R., Natale J., Stoica B., Lea IV P. M., Movsesyan V., Ahmed F., Knoblach S.M., Fricke S. T., e Faden A. I., (2004) The “Dark Side” of Endocannabinoids: A Neurotoxic Role for Anandamide, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 24:564–578
21. Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P, (2001) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* 20: 7033–7040
22. Chen Y, Buck J, (2000) Cannabinoids protect cells from oxidative cell death: a receptor-independent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 807–812

23. Chen Y, McCarron RM, Ohara Y, Bembry J, Azzam N, Lenz FA, Shohami E, Mechoulam R, Spatz M, (2000) Human brain capillary endothelium: 2 arachidonoglycerol (endocannabinoid) interacts with endothelin-1. *Circ Res* 87: 323-327

24. Childers SR, Sexton T, Roy MB (1994) Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochem Pharmacol* 47:711-715.

25. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9371-9376

26. Dagon Y, Avraham Y, Ilan Y, Mechoulam R, Berry EM (2007). Cannabinoids ameliorate cerebral dysfunction following liver failure via AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 21:2431-2441

27. de Lago E e Fernández-Ruiz JJ, (2007), Cannabinoids and Neuroprotection in Motor-Related Disorders, *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 6, 377-387

28. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R, (1992) Isolation and

- structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
29. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D, (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10819-10824.
30. Doble A, (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81: 163–221
31. Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA, (1993) Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7656-7660.
32. Fernández-Ruiz JJ, Lastres-Becker I, Cabranes A, González S, Ramos JA, (2002) Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prost Leukot Essent Fatty Acids* 66: 263–273
33. Fernández-Ruiz JJ, Romero J, Velasco G, Toló RM, Ramos JA e Guzmán M, (2006) Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?, *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.28 No.1, 39-45

34. Ferreira JJ, Sepúlveda MR, Pilão C, (1999); Estimation of the prevalence and incidence of Alzheimer's Disease in Portugal up to 2010. *Eur. J. Neurol.* 6 (Suppl. 3): 69

35. Filbert MG, Forster JS, Smith CD, Ballough GP, (1999). Neuroprotective effects of HU-211 on brain damage resulting from soman-induced seizures. *Ann NY Acad Sci* 890:505–514.

36. Fowler C.J, (2007) The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action, *Br J Pharmacol.* 152 (5): 594-601

37. Ghosh S, Preet A, Groopman JE, Ganju R, (2006) Cannabinoid receptor CB2 modulates the CXCL12/CXCR4-mediated chemotaxis of T-lymphocytes. *Mol Immunol* 43: 2169–2179.

38. Godoy-Matos, AF; Guedes EP; Souza LL; Valério CV, (2006) The endocannabinoid system: a new paradigm in the metabolic syndrome treatment *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.50 no.2, pag 390-9

39. González-Scarano F, Martín-García J, (2005) The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 5: 69–81.

40. Grundy RI, Rabuffeti M, Beltramo M, (2001) Cannabinoids and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 24: 29–52

41. Gurley R.J., Aranow R., Katz M., (1998). Medicinal marijuana: a comprehensive review. *Journal of Psychoactive Drugs* 30, 137–147.
42. Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I, (2001) Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J Mol Med* 78: 613–625
43. Guzmán M., (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* 3, 745–755
44. Guzmán. M., Duarte M.J., Blazquez C., (2006) A pilot clinical study of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Br J Cancer*;95:197–203.
45. Hamelink C., Hampson A., Wink D.A., Eiden L.E., Eskay R.L., (2005) Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity., *J Pharmacol Exp Ther.* Aug;314(2):780-8
46. Hampson A.J., Bornheim L.M., Scanziani M., Yost C.S., Gray A.T., Hansen B.M., Leonoudakis D.J., Bickler P.E., (1998) Dual effects of anandamide on NMDA receptor mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem* 70: 671–676

47. Hampson A.J., Grimaldi M., Axelrod J., Wink D., (1998) Cannabidiol and $(-)\Delta^9$ tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8268–8273

48. Hansen H.H., Schmid P.C., Bittigau P., Lastres-Becker I., Berrendero F., Manzanares J., Ikonomidou C., Schmid H.H., Fernandez-Ruiz J.J., Hansen H.S., (2001) Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem* 78: 1415–1427

49. Hansen H.H., Azcoitia I., Pons S., Romero J., Garcia-Segura L.M., Ramos J.A., Hansen H.S., Fernandez-Ruiz J., (2002) Blockade of cannabinoid CB1 receptor function protects against in vivo disseminating brain damage following NMDA-induced excitotoxicity. *J Neurochem* 82: 154–158

50. Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I., Cabral G., Casellas P., Devane W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.R., Mechoulam R. e Pertwee R.G., (2002), International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors, Vol. 54, Issue 2, 161-202

51. Iuvone T., Esposito G., Esposito R., Santamaria R., Di Rosa M., Izzo A.A., (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive

- component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 89: 134–141
52. Kaul M., Garde G.A., Lipton S.A., (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* 410: 988–994.
53. Klein T.W., Lane B., Newton C.A., Friedman H., (2000) The cannabinoid system and cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med* 225: 1–8
54. Knoller N., Levi L., Shoshan I., Reichenthal E., Razon N., Rappaport Z.H., Biegon A., (2002) Dexanabinol (HU-211) in the treatment of severe closed head injury: a randomized, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Crit Care Med* 30: 548–554
55. Köfalvi A., (2008) *Cannabinoids and the Brain*, Springer Science+Business Media, LLC, New York
56. Lambert D.M., Di Marzo V., (1999) The palmitoylethanolamida and oleamide enigmas: are these two fatty acid cannabimimetic? *Curr Med Chem* 6:757-773
57. Lastres-Becker I., Cebeira M., de Ceballos M., Zeng B-Y., Jenner P., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J., (2001) Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients

- with Parkinson's disease and MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci* 14: 1827–1832
58. Lastres-Becker I., Fezza F., Cebeira M., Bisogno T., Ramos J.A., Milone A., Fernández-Ruiz J.J., Di Marzo V., (2001) Changes in endocannabinoid transmission in the basal ganglia in a rat model of Huntington's disease. *Neuroreport* 12: 2125–2129
59. Lastres-Becker I., Gómez M., de Miguel R., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J., (2002) Loss of cannabinoid CB1 receptors in the basal ganglia in the late akinetic phase of rats with experimental Huntington's disease. *Neurotox Res* 4: 601–608
60. Lastres-Becker I., Hansen H.H., Berrendero F., de Miguel R., Pérez-Rosado A., Manzanares J., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J., (2002) Loss of cannabinoid CB1 receptors and alleviation of motor hyperactivity and neurochemical deficits by endocannabinoid uptake inhibition in a rat model of Huntington's disease. *Synapse* 44: 23–35
61. Lastres-Becker I., Berrendero F., Lucas J.J., Martin E., Yamamoto A., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J. (2002) Loss of mRNA levels, binding and activation of GTP-binding proteins for cannabinoid CB1 receptors in the basal ganglia of a transgenic model of Huntington's disease. *Brain Res* 929: 236–242

62. Lastres-Becker I., De Miguel R., Fernández-Ruiz J. J., (2003) The endocannabinoid system and Huntington's disease. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord* 2: 335–347

63. Lastres-Becker I., Bizat N., Boyer F., Hantraye P., Brouillet E., Fernández-Ruiz J.J., (2003) Effects of cannabinoids in the rat model of Huntington's disease generated by an intrastriatal injection of malonate. *Neuroreport* 14: 813–816

64. Lastres-Becker I., de Miguel R., De Petrocellis L., Makriyannis A., Di Marzo V., Fernández-Ruiz J.J., (2003) Compounds acting at the endocannabinoid and/or endovanilloid systems reduce hyperkinesias in a rat model of Huntington's disease. *J Neurochem* 84: 1097–1109

65. Lastres-Becker I., Bizat N., Boyer F., Hantraye P., Fernández-Ruiz J.J., Brouillet E., (2004) Potential involvement of cannabinoid receptors in 3-nitropropionic acid toxicity in vivo: implication for Huntington's disease. *Neuroreport* 15: 2375–2379

66. Lastres-Becker I., Molina-Holgado F., Ramos J.A., Mechoulam R., Fernández-Ruiz J.J., (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: Relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*; 19(1-2):96-107

67. Maas A.I., Murray G., Henney H. 3rd, Kassem N., Legrand V., Mangelus M., Muizelaar J.P., Stocchetti N., Knoller N., (2006); Efficacy and safety of dexamabinol in severe traumatic brain injury: results of a phase III randomised, placebo-controlled, clinical trial. *Lancet Neurol*, 5:38–45.
68. Marsicano G., Moosmann B., Hermann H., Lutz B., Behl C., (2002) Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem* 80: 448–456
69. Marsicano G., Goodenough S., Monory K., Hermann H., Eder M., Cannich A., Azad S.C., Cascio M.G., Gutierrez S.O., van der Stelt M., (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302: 84–88
70. Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I., (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* .; 346 : 561 - 564 .
71. Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R., Gopher A., Almog S., Martin B.R., Compton D.R., (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90.
72. Mechoulam R., Panikashvili A., Shohami E., (2002) Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol Med* 8: 58–61

73. Mechoulam R., Spatz M., Shohami E., (2002) Endocannabinoids and neuroprotection. *Sci STKE* 129/RE5
74. Milton N.G., (2002) Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid- beta peptide. *Neurosci Lett* 332: 127–130
75. Molina-Holgado F., Pinteaux E., Moore J.D., Molina-Holgado E., Guaza C., Gibson R.M., Rothwell N.J., (2003) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci* 23: 6470–6474
76. Movsesyan V.A., Stoical B.A., Yakovlev G.A., Knoblach1 S.M., Lea IV P.M., Cernak I., Vink R. e Faden A.I., (2004) Anandamide-induced cell death in primary neuronal cultures: role of calpain and caspase pathways, (2004) *Cell Death and Differentiation* 11, 1121–1132
77. Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M., (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature .*; 365 : 61 - 65
78. Nagayama T., Sinor A.D., Simon R.P., Chen J., Graham S.H., Jin K.L., Greenberg D.A., (1999) Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* 19: 2987–2995

79. Núñez E., Benito C., Pazos M.R., Barbachano A., Fajardo O., Gonzalez S., (2004). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53: 208–213.
80. O’Sullivan S.E., (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors, *British Journal of Pharmacology* 152, 576–582
81. Okamoto Y., Morishita J., Tsuboi K., Tonai T., Ueda N. (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279:5298-5305
82. Onaivi E.S., Suguira T., Di Marzo V., (2006). *Endocannabinoids: The Brain and Body's Marijuana and Beyond*. Boca Raton: Taylor and Francis;
83. Pacher P, Bátkai S, e Kunos G, (2006) The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy, *Pharmacol Rev.*; 58(3): 389–462.
84. Pacher P e Hasko G, (2008) Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischaemia–reperfusion injury and preconditioning, *British Journal of Pharmacology* 153, 252–262
85. Pan X, Ikeda SR, Lewis DL (1996) Rat brain cannabinoid receptor modulates N type Ca²⁺ channels in a neuronal expression system. *Mol Pharmacol* 49: 707–714

86. Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E (2001) Cannabinoids in neurodegeneration and neuroprotection An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413: 527-531

87. Parmentier-Batteur S, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22: 9771-9775

88. Pazos MR, Núñez E, Benito C, Tolón RM, Romero J (2004) Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. *Life Sci* 75: 1907-1915

89. Pazos MR, Sagredo O. e Fernández-Ruiz JJ, (2008), The Endocannabinoid System in Huntington's Disease, *Current Pharmaceutical Design*, 14(23):2317-25.

90. Pertwee RG (2002) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 95: 165-174

91. Pertwee RG. (2005);Pharmacological actions of cannabinoids. In: Pertwee RG , ed. *Cannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology*. Heidelberg, Germany : Springer-Verlag ; 168 :1- 51.

92. Polster BM, Fiskum G., (2004): Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis, *J Neurochem.* 90 (6): 1281-9
93. Raman C, McAllister SD, Rizvi G, Patel SG, Moore DH, Abood ME (2004) Amyotrophic lateral sclerosis: delayed disease progression in mice by treatment with a cannabinoid. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 5: 33–39
94. Ramírez BG, Blázquez C, Pulgar TG, Guzmán M, Ceballos ML, (2005), Prevention of Alzheimer's Disease Pathology by Cannabinoids: Neuroprotection Mediated by Blockade of Microglial Activation, *The Journal of Neuroscience*, 25(8):1904–1913
95. Rockwell CE, Kaminski NE (2004). A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 683–690.
96. Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE (2006). Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol* 70: 101–111.

97. Romero J, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz J (1998) The activation of cannabinoid receptors in striatonigral neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci* 62: 351–363

98. Sánchez, C., Ceballos ML, Pulgar TG, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Cajal SM and Guzmán M (2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB2 cannabinoid receptor. *Cancer Res.* 61, 5784–5789

99. Sañudo-Peña MC, Patrick SL, Khen S, Patrick RL, Tsou K, Walker JM (1998) Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 248: 171–174

100. Schinelli S (2002) The brain endothelin system as potential target for brain related pathologies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1: 543–553

101. Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22: 565–572

102. Shen M, Thayer SA (1998) Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Mol Pharmacol* 54: 459–462

103. Shohami E e Mechoulam R, (2000) Dexanabinol (HU-211): A Nonpsychotropic Cannabinoid With Neuroprotective Properties, *Drug Development research* 50:211–215

104. Shoulson I. (1998); Experimental therapeutics of neurodegenerative disorders: unmet needs. *Science* 282:1072–1074.

105. Stahel PF, Smith WR, Bruchis J, e Rabb CH, (2008) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: “Key” Regulators of Neuroinflammation after Traumatic Brain Injury, Hindawi Publishing Corporation , PPAR Research, Volume 2008

106. Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N (2004) Biosynthesis of anandamide and N-palmitoethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J* 380:749-756

107. van der Stelt M, Veldhuis WB, Bar PR, Veldink GA, Vliegenthart JF, Nicolay K (2001) Neuroprotection by D9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *J Neurosci* 21: 6475–6579

108. van der Stelt M, Veldhuis WB, van Haaften GW, Fezza F, Bisogno T, Bär PR, Veldink GA, Vliegenthart JF, Di Marzo V, Nicolay K (2001)

- Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. *J Neurosci* 21: 8765–8771
109. van der Stelt M, Veldhuis WB, Maccarrone M, Bar PR, Nicolay K, Veldink GA, Di Marzo V, Vliegenthart JF (2002) Acute neuronal injury, excitotoxicity, and the endocannabinoid system. *Mol Neurobiol* 26: 317–346
110. Vasquez C., Navarro-Polanco RA, Huerta M, Trujillo X, Andrade F, Trujillo Hernandez B, Hernandez L (2003) Effects of cannabinoids on endogenous K⁺ and Ca²⁺ currents in HEK293 cells. *Can J Physiol Pharmacol* 81:436-442.
111. Velasco, G. et al. (2004) Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? *Neuropharmacology* 47, 315–323
112. Waksman Y, Olson JM, Carlisle SJ e Cabral GA (1999) The Central Cannabinoid Receptor (CB1) Mediates Inhibition of Nitric Oxide Production by Rat Microglial Cells, *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, Vol. 288, Issue 3, 1357-1366
113. Walter L, Stella N (2004) Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol* 141: 775–785

114. Werner P, Pitt D, Raine CS (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 50: 169–180

115. Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M (1994) Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 63: 637–652

116. Weydt P, Hong S, Witting A, Möller T, Stella N, Kliot M, (2005) Cannabinol delays symptom onset in SOD1 (G93A) transgenic mice without affecting survival, *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* (3):182-184

117. Wirguin I, Mechoulam R, Breuer A, Schezen E, Weidenfeld J, Brenner T (1994) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by cannabinoids. *Immunopharmacology* 28: 209–214

118. Witting A, Stella N (2005) Cannabinoid signaling in glial cells in health and disease. *Curr Neuroparmacol*; Volume 2, Number 1, pp. 115-124(10)

119. Zajicek J P, Sanders H P, Wright D E, Vickery P J, Ingram W M, Reilly S M, Nunn A J, Teare L J, Fox P J, Thompson A J, (2005) Cannabinoids in

multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;76:1664–1669.

120. Zhuang SY, Bridges D, Grigorenko E, McCloud S, Boon A, Hampson RE, Deadwyler SA, (2005) Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores, *Neuropharmacology* 48 1086-1096